

DALTON LUIZ SCHIESSEL

**EFEITO DA DEFICIÊNCIA MARGINAL DE ZINCO NA FASE
INICIAL DA GESTAÇÃO DE RATAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Biologia Celular e Molecular, Universidade Federal do Paraná Setor de Ciências Biológicas, Departamento de Biologia Celular, como requisito parcial para a obtenção do título de mestre em Biologia Celular.

Orientador: Prof. Dr. Cláudio P. S. Greca.

Curitiba

2004

AGRADECIMENTOS

Ao término de uma dissertação de mestrado, a sensação que temos é que o mérito desta conquista somente é atribuído para quem a defendeu. Contudo se olharmos para trás verificamos que diversas pessoas ajudaram a construir este caminho. Muitas vezes eles foram árdusos e desafiados, outros plácidos. Nestes primeiros a mão estendida para a ajuda, auxílio e conforto foram indispensáveis daqueles parentes, professores e amigos que desejam o nosso sucesso. A todos estes sou grato em especial:

Ao Prof. Dr Cláudio de Paula Soares Greca, agradeço especial primeiramente por ter me recebido e acreditado em minha proposta de trabalho. Pela amizade e durante o transcorrer do tempo sempre incentivando, principalmente naqueles momentos difíceis.

À Prof^a. Dr^a. Dorly de Freitas Buchy, agradeço por sempre trazer palavras sábias em todos os momentos ressaltando naqueles conflitantes. Também em disponibilizar os recursos financeiros para a aquisição das rações.

Ao Prof. Dr. Luiz Cláudio Fernandes, sempre questionador, ajudando a resolver problemas conflitantes nos resultados desta dissertação.

Ao Prof. Dr. Silvio Sanches Veiga, ao ceder as instalações do laboratório que coordena para a realização de parte deste trabalho e aos anticorpos cedidos para a realização de imunohistoquímica.

A Prof^a. Dr^a. Márcia Helena Mendonça, Professora responsável pela disciplina de Biologia Celular neste programa. Muitas vezes me espelho em sua competência em ensinar para progredir na vida docente.

Ao Prof Dr. Ciro Alberto de Oliveira, Professor da disciplina de Técnicas Básicas em Microscopia, a qual foi fundamental em toda a parte prática deste trabalho.

A Prof^a. Dr^a. Edith Fanta, ao ceder o fotomicroscópio de seu laboratório para a confecção das fotos.

Aos Professores Ivo Hartmann, Luiz Fernando Favaro e Marco Randi e Professoras Célia Regina C. Franco e Lucélia Donatti pelos momentos de ajuda, incentivo e amizade durante este período.

Ao LACTEC – Instituto de Tecnologia para o Desenvolvimento, Departamento de Química Aplicada – UTQA, que gentilmente fez as análises de Espectrometria de Emissão atômica com atomização em Chama.

Aos amigos do curso de mestrado que sempre estiveram juntos com seus sucessos e infortúnios, todos nós “vivemos a tese”*. Em especial à Carolina, Luciane (orientadas Prof^a Dorly); Maritana (orientada Prof. Ciro); Natália, Ricardo, Cláudia e Júlia (orientados Prof. Luiz Cláudio) e Márcia, Ana, Olga, Simone e Elisângela (orientadas Prof. Sílvio).

As estagiárias Juliana, Morgiana e Juliana do curso de Nutrição e Carla do curso de Biologia pela ajuda em vários momentos.

Aos amigos Luiz Fernando Bianchini e Gabriel M. C. Leão, pela amizade e pelo auxílio inicial para o perfeito entrosamento no laboratório. Sempre prestativos com as dúvidas lá existentes.

Aos amigos do Biotério da UFPr, sempre prestativos, em especial o Cândido, Luiz e Dona Tereza.

À Marlene, secretária da Pós-graduação sempre resolvendo os nossos problemas com serenidade.

À Ana, que sempre deixava alguns alunos filar um cafezinho.

Aos Grandes Amigos e Irmãos Marcos André e Sônia, sempre pelo incentivo profissional e amizade (pelo menos 30 anos) e que estes laços nos unam cada vez mais, tornando-se fortes. Aos Amigos Luiz Costa e Erineth, Jean e Luciana, pelo apoio e a amizade e lembrando sempre que: “amigo é coisa pra se guardar a sete chaves do lado esquerdo do peito”.

À Minha Família, Rita, Luiz Fernando, Ian, Luiz Gustavo, Murilo, Lenise, Vitor André, Viviane, José Mauro, Bernardo, Gabriela, Irene, Carlos Roberto, Michely e João Neto.

Aos Meus Pais Renato e Raquel, vocês que me colocaram no mundo, toda minha gratidão, amor por todos estes anos nos ajudando de forma ilimitada. Sempre pensando em nosso bem estar. Dedicando suas vidas aos seus filhos, eu dedico a vocês este dia.

À minha mulher Cisley. Você que esteve sempre ao meu lado neste período, apoiando e chorando nos momentos de dificuldade, rindo nos momentos de alegria. Você é fundamental na minha vida. Agora carrega em sua barriga o fruto de nosso amor (que logo chegará) dando a nossa vida um maior sentido e trazendo mais felicidade. Amá-la é tudo.

* Freitas, M. E. Viver a Tese é Preciso? Reflexões sobre as Aventuras e desventuras da vida acadêmica. REA - Revista de Administração de Empresa – São Paulo.v 42 - n 1 pg 88 93 - 2002.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE ABREVIATURAS	ix
RESUMO	x
ABSTRACT	xi
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Biologia da Decídua	1
1.2 Mecanismos de Absorção, Excreção e Transporte de Zinco nos Tecidos	3
1.3 Metalotioneínas, Metabolismo do Zinco e Gestação	6
1.4 O Zinco e sua Deficiência nos Eventos da Reprodução	7
2. OBJETIVOS	12
2.1 Geral	12
2.2 Específicos	12
3. MATERIAIS E MÉTODOS	13
3.1 Laboratório	13
3.2 Animais	13
3.3 Controle do Ganho de Peso e Consumo da Ração	14
3.4 Determinação das Fases do Ciclo Estral	14
3.5 Acasalamento	15
3.6 Coleta dos Sítios de Implantação	15
3.7 Coleta do Sangue e Separação do Plasma	15
3.8 Localização dos Sítios de Implantação	16
3.9 Metodologia para Microscopia de Luz	16
3.10 Técnicas de Coloração	17
3.10.1 Hematoxilina-Eosina	17
3.11 Análise Morfométrica	17
3.12 Análise Estatística	17
4. RESULTADOS	18
4.1 Ganho de Peso	18
4.1.1 Fase de crescimento	18
4.1.2 Fase de gestação (Dias 6, 7 e 8)	19
4.1.2.1 Período de 6 dias de gestação	19
4.1.2.2 Período de 7 dias de gestação	20
4.1.2.3 Período de 8 dias de gestação	21
4.2 Consumo de Ração	22

4.2.1 Fase de crescimento	22
4.2.1.1 Animais agrupados	22
4.2.1.2 Animais individualizados	23
4.2.2 Consumo de Ração durante a Gestação	24
4.3 Concentração Plasmática de Zinco	26
4.4 Número de Sítios de Implantação	27
4.5 Análises Histológicas dos Sítios de Implantação	28
4.5.1 Dia 6 da gestação	29
4.5.2 Dia 7 da gestação	32
4.5.3 Dia 8 da gestação	35
4.6 Análise Morfométrica	38
5 DISCUSSÃO	40
5.1 Consumo de Ração e Ganho de Peso com Dietas DZA e DZD	40
5.2 Concentração do Zinco Plasmático	42
5.3 Número de Sítios de Implantação e Morfologia da Decídua	44
6 CONCLUSÃO	51
ANEXOS	52
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Sítio de implantação do dia 6 da gestação (Grupo G6) tratado com Dieta Zinco Adequada (DZA). Observar o embrião (**E**) e as 03 regiões da decídua antimesometrial (**ZDM, ZPD e ZND**). Coloração HE. 60 x. pg 30

Figura 2 – Sítio de implantação do dia 6 da gestação (Grupo G6) tratado com dieta zinco adequada (DZA). Observar o embrião (**E**), epitélio (**EP**), cripta uterina (**C**) e as 03 regiões da decídua antimesometrial (**ZDM, ZPD e ZND**). Coloração HE. 120 x. pg 30

Figura 3 - Sítio de implantação do dia 6 da gestação (Grupo G6) tratado com dieta zinco deficiente (DZD). Observar o embrião (**E**) e as 03 regiões da decídua antimesometrial (**ZDM, ZPD e ZND**). Coloração HE. 60 x. pg 30

Figura 4 – Sítio de implantação do dia 6 da gestação (Grupo G6) tratado com dieta zinco deficiente (DZD). Observar o embrião (**E**), epitélio (**EP**), cripta uterina (**C**) e as 03 regiões da decídua antimesometrial (**ZDM, ZPD e ZND**). Coloração HE. 120 x. pg 30

Figura 5 – Sítio de implantação do dia 6 da gestação (Grupo G6) tratado com dieta zinco adequada (DZA). Observar o embrião (**E**) e 02 regiões da decídua antimesometrial (**ZDM e ZPD**). Coloração HE. 480 x. pg 31

Figura 6 - Sítio de implantação do dia 6 da gestação (Grupo G6) tratado com dieta zinco deficiente (DZD). Observar o embrião (**E**) e 02 regiões da decídua antimesometrial (**ZDM e ZPD**). Coloração HE 480 x. pg 31

Figura 7 – Sítio de implantação do dia 7 da gestação (Grupo G7) tratado com dieta zinco adequada (DZA). Observar o embrião (**E**) e as 03 regiões da decídua antimesometrial (**ZDM, ZPD e ZND**). Coloração HE. 60 x. pg 33

Figura 8 – Sítio de implantação do dia 7 da gestação (Grupo G7) tratado com dieta zinco adequada (DZA). Observar o embrião (**E**), 02 regiões da decídua antimesometrial (**ZDM e ZPD**). Coloração HE. 120 x. pg 33

Figura 9 - Sítio de implantação do dia 7 da gestação (Grupo G7) tratado com dieta zinco deficiente (DZD). Observar o embrião (**E**) e as 03 regiões da decídua antimesometrial (**ZDM, ZPD e ZND**). Coloração HE. 60 x. pg 33

Figura 10 - Sítio de implantação do dia 7 da gestação (Grupo G7) tratado com dieta zinco deficiente (DZD). Observar o embrião (**E**), 02 regiões da decídua antimesometrial (**ZDM e ZPD**). Coloração HE. 120 x. pg 33

Figura 11 – Sítio de implantação do dia 7 da gestação (Grupo G7) tratado com Dieta Zinco Adequada (DZA). Observar o embrião (**E**), 02 sub-regiões da ZDM, a **ZDP** (zona decidual primária) e a **ZDS** (zona decidual secundária). Coloração HE. 480 x. pg 34

Figura 12 - Sítio de implantação do Dia 7 da Gestação (Grupo G7) tratado com Dieta Zinco Deficiente (DZD). Observar o embrião (E) e as 02 sub-regiões da ZDM. Coloração HE 480 x. pg 34

Figura 13 – Sítio de implantação do dia 8 da gestação (Grupo G8) tratado com dieta zinco adequada (DZA). Observar o embrião (E) e as 03 regiões da decídua antimesometrial (**ZDM, ZPD e ZND**). Coloração HE. 60 x. pg 36

Figura 14 - Sítio de implantação do dia 8 da gestação (Grupo G8) tratado com dieta zinco adequada (DZA). Observar o embrião (E) e a **ZDM**. Coloração HE. 120 x. pg 36

Figura 15 - Sítio de implantação do dia 8 da gestação (Grupo G8) tratado com dieta zinco deficiente (DZD). Observar o embrião (E) e as 03 regiões da decídua antimesometrial (**ZDM, ZPD e ZND**). Coloração HE. 60 x. pg 36

Figura 16 - Sítio de implantação do dia 8 da gestação (Grupo G8) tratado com dieta zinco deficiente (DZD). Observar o embrião (E) e a **ZDM**. Coloração HE. 120 x. pg 36

Figura 17 - Sítio de implantação do dia 8 da gestação (Grupo G8) tratado com dieta zinco adequada (DZA). Observar na região antimesometrial a **ZDM** e o embrião (E). Coloração HE. 480 x. pg 37

Figura 18 - Sítio de implantação do dia 8 da gestação (Grupo G8) tratado com dieta zinco deficiente (DZD). Observar na região antimesometrial a **ZDM** e o embrião (E). Coloração HE. 480 x. pg 37

LISTA DE ABREVIATURAS

C – Cripta Uterina
DNA – Ácido Desoxirribonucléico
DZA – Dieta Zinco Adequada
DZD – Dieta Zinco Deficiente
E – Embrião
EP – Epitélio
HE – Hematoxilina Eosina
MEC – Matriz Extracelular
MMPs – Metaloproteinases
MT – Metalotioneína
RNA – Ácido Ribonucléico
ROS – Espécies Reativas do Oxigênio
T – Tioneína
T.A. – Temperatura Ambiente
TIMPs – Inibidores Teciduais das Metaloproteinases
ZDM – Zona de Células Deciduais Maduras
ZDP – Zona Decidual Primária
ZDS – Zona Decidual Secundária
Zn – Zinco
ZND – Zona Não Decidualizada
ZNT – Transportador de Zinco
ZPD – Zona de células pré-deciduais

RESUMO

A decidualização nos roedores, compreende uma complexa remodelação do endométrio sensibilizado por uma seqüência hormonal adequada, mediada por eventos celulares a partir da interação do blastocisto com o epitélio uterino. A decídua antimesometrial de ratas pode ser identificada a partir do dia 6 da gestação, sendo formada por três áreas, que se distinguem basicamente pelo maior ou menor grau de diferenciação dos fibroblastos endometriais em células deciduais. A primeira região, adjacente ao epitélio, apresenta células deciduais já totalmente diferenciadas, sendo denominada Zona de Células Deciduais Maduras. O zinco (Zn) é um dos metais mais importantes na nutrição humana, sendo sua deficiência um problema nutricional mundial. A deficiência de Zn ao longo da gestação afeta não somente a produção de hormônios, como também alcança uma ampla variedade de enzimas envolvidas nos mecanismos reprodutivos e embrionários. De acordo com a literatura, a deficiência de Zn apresenta diversos efeitos deletérios em muitos estágios da gestação, desde fases precoces (com redução da taxa de sucesso de implantação, aumento da taxa de reabsorção dos embriões, anormalidades da cavidade da blastocle e defeitos de fechamento no tubo neural). Apesar da riqueza de dados da literatura acerca do padrão de desenvolvimento embrionário, pouco se sabe a respeito de possíveis alterações no desenvolvimento do processo de decidualização, especialmente na fase de implantação embrionária. Quando o fornecimento de Zn dietético por longos períodos é muito baixo, ou se a ingestão de Zn é marginal, ajustes homeostáticos do organismo materno podem ser suficientes para compensar as deficiências da ingestão do metal. Neste caso podem ocorrer modificações na absorção e excreção no trato gastrointestinal e renal e uma maior utilização do íon mediada por proteínas de transporte de zinco (as Tioneínas). Estas modificações constituem um dos principais mecanismos para manter a homeostase do metal e sua redistribuição tecidual e celular. Em vista deste embasamento, o objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos decorrentes no processo de decidualização com a utilização de dieta marginalmente deficiente em Zn nos estágios iniciais da gestação de ratas (dias 6, 7 e 8 da gestação). Ratas recém-desmamadas foram divididas em dois grupos experimentais, sendo mantidas até os estágios iniciais da gestação. O primeiro grupo recebeu dieta contendo quantidade adequada de zinco na ração (Grupo Dieta Zinco Adequada), enquanto que o outro grupo foi tratado com dieta marginalmente deficiente de zinco (Grupo Dieta Zinco Deficiente). Foram analisados pelo menos três parâmetros relacionados ao processo nutricional de ambos os grupos: 1) consumo médio de ração e ganho de peso dos animais nas fases de crescimento dos animais e fase gestacional; 2) análise quantitativa de zinco plasmática e; 3) análise histomorfométrica da Zona Decidual Madura, da decídua antimesometrial. Todos os parâmetros foram considerados em estudo estatístico. Os resultados obtidos no modelo experimental adotado, mostraram a inexistência de diferenças estatísticas significantes nos parâmetros estudados, um indicativo de que, nestas condições a deficiência ou não de zinco no alimento parece não influir decisivamente no processo inicial da gestação.

ABSTRACT

Decidualization in rodents comprises a complex remodeling of the endometrium sensitized by an adequate hormonal sequence, mediated by cellular events starting from the interaction of the blastocyst with the uterine epithelium. The antimesometrial decidua of rats can be identified from day 6 of pregnancy on, consisting of three areas, which differentiate from one another basically by its greater or smaller degree of differentiation of the endometrial fibroblasts in decidual cells. The first area, close to the epithelium, presents decidual cells completely differentiated already, which is called Mature Decidual Cells Zone. Zinc (Zn) is one of the most important metals in human nutrition, and its deficiency is a worldwide nutritional problem. Throughout pregnancy, Zn deficiency affects not only hormone production but also reaches a wide variety of enzymes involved in the reproductive and embryonic mechanisms. According to the literature, Zn deficiency presents various deleterious effects in many stages of pregnancy, even in the early stages (with reduction in success rates of implantation, raise in the reabsorption rates of embryos, abnormalities in the blastocoel cavity, and defects in the neural tube's closure). Although the literature abounds in data concerning the standard of embryonic development, little do we know about the possible alterations in the development of the decidualization process, particularly in what concerns the embryonic implantation phase. When the supply of dietary Zn is very low for long periods of time, or if the Zn intake is marginal, homeostatic adjustments of the mother's organism may suffice to compensate the deficiencies in the metal intake. In this case, modifications may occur in its absorption and excretion both in the gastrointestinal and in the renal tracts, and a greater use of the ion mediated by Zn carrier proteins (the Thioneines) may take place. These modifications constitute one of the main mechanisms for maintaining the metal's homeostasis and its cell and tissue redistribution. Having this foundation in mind, the aim of the present work is to evaluate the resulting effects in the decidualization process using a diet marginally deficient in Zn in the early stages of pregnancy in rats (days 6, 7 and 8 of pregnancy). Recently weaned rats were divided into two experimental groups and were kept until the early stages of pregnancy. The first group was fed a ration containing an adequate amount of zinc in it (the Adequate Zinc Diet Group), whereas the other group was given a diet marginally deficient in zinc (the Zinc Deficient Diet). At least three parameters were analyzed in both groups: 1) the average ration intake and weight gain of the animals in the growing phase and in the pregnancy phase; 2) quantitative analysis of plasmatic zinc; and 3) histomorphometric analysis of the Mature Decidual Zone Cells of the antimesometrial decidua. All parameters were statistically treated. The results obtained in the experimental model adopted show the absence of statistically significant differences in the parameters studied, an indication that, in such conditions, either the presence or the absence of zinc deficiency in the diet seems to exert no conclusive influence in the early stage of pregnancy.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Biologia da Decídua

A implantação bem sucedida de embriões na mucosa uterina compreende uma complexa série de eventos celulares, que se iniciam com a interação do blastocisto com o útero sensibilizado por uma seqüência hormonal adequada de estrógeno-progesterona-estrógeno (FINN, 1977; ROMAGNANO & BABIARZ, 1990; FARRAR & CARSON, 1992; IWAHASHI et al.,1996; SHARKEY et al.,1996). Para que a implantação tenha sucesso, o embrião deve alcançar um nível apropriado de desenvolvimento, enquanto que o endométrio deve exibir um estado ideal de receptividade para este embrião (ABRAHAMSOHN & ZORN, 1993). Todo o processo de implantação promove profundas modificações no endométrio de várias espécies de roedores, incluindo o camundongo e o rato (FINN, 1977; FARRAR & CARSON, 1992; HURST & PALMAY, 1999). O conjunto destas modificações denomina-se decidualização (ABRAHAMSOHN E ZORN, 1993).

A decidualização, uma das etapas iniciais da implantação embrionária, é um processo altamente regulado, caracterizado também por uma variedade de eventos celulares e moleculares, incluindo: 1) aumento da permeabilidade vascular; 2) aumento da síntese de ácido desoxiribinucléico (DNA) e; 3) hipertrofia, síntese e deposição de componentes da matriz extracelular (FARRAR & CARSON, 1992). Este conjunto de modificações leva à diferenciação do fibroblasto endometrial em células deciduais poliplóides (Bany et al., 2000).

Nos roedores, no início da gestação, os fibroblastos endometriais apresentam-se como células fusiformes, com longos prolongamentos, núcleo grande e ovóide com cromatina frouxa. O contato do blastocisto com o epitélio uterino constitui-se no estímulo mecânico que promove a transformação dos fibroblastos endometriais em células deciduais. A partir do epitélio uterino estimulado, são liberadas diversas moléculas (tais como, prostaglandinas, histamina) que ao interagirem com os fibroblastos endometriais, promovem sua diferenciação em células deciduais (DE FEO, 1967; FINN, 1971). A transformação, durante a gravidez, das células do estroma endometrial para células deciduais, é uma resposta normal para a implantação do blastocisto (SPENCER et al., 1998).

Nas ratas, as regiões uterinas onde os blastocistos se implantam e, onde se estabelece a decidualização, denominam-se sítios de implantação (ABRAHAMSOHN & ZORN, 1993). A decídua antimesometrial de ratas, objeto de estudo deste projeto, já pode ser identificada no sexto dia da gestação (FINN & MCLAREN, 1967). Esta região desenvolve-se durante curto espaço de tempo geneticamente pré-determinado, atingindo seu ponto máximo de desenvolvimento, em roedores, pelo dia 8 ou 9 da gestação (FINN, 1977). A decídua antimesometrial de ratas nos sítios de implantação, é formada por três áreas de decidualização, sem delimitação evidente, desenvolvendo-se de forma centrífuga a partir do epitélio da cripta uterina em direção ao miométrio. Tais áreas se distinguem basicamente pelo maior ou menor grau de diferenciação dos fibroblastos endometriais em células deciduais. A primeira região, adjacente ao epitélio, apresenta células deciduais já totalmente diferenciadas (maduras), sendo denominada Zona de Células Deciduais Maduras (ZDM). Nela ainda se distinguem duas sub-regiões: a Zona Decidual Primária (ZDP), imediatamente abaixo do epitélio uterino e a Zona Decidual Secundária (ZDS), situada um pouco mais distante. Os espaços intercelulares nesta zona, são um pouco mais amplos em relação à zona anterior (ZDP). Nela já se detectou, em camundongos, aumento na espessura de fibrilas de colágeno (ZORN, 1986). Vários relatos da literatura sugerem, em análises de decídua madura de camundongos, a presença de diversas variedades de proteoglicanas, tanto as associadas ao colágeno, como também de superfície celular e de espaços intercelulares (GRECA, 1996; GRECA et al., 1998; SOARES GRECA et al., 2000). Do ponto de vista funcional, a ZDS parece atuar no sentido de conter a invasão do trofoblasto no endométrio; remodelar o endométrio degradando e reorganizando a matriz extracelular; formar uma barreira entre o blastocisto e a circulação materna (PARR & PARR, 1986), impedindo que moléculas como imunoglobulinas, microorganismos e outras células imunocompetentes alcancem o embrião. Shelesnyak (1962) considera a decídua como uma estrutura receptiva à invasão do trofoblasto. Ainda deve ser considerado o papel nutricional da decídua em relação ao embrião. Observando a ultra-estrutura da decídua de porquinhos-da-índia relatou que o tecido tem a função de nutrição e contenção do trofoblasto. Células deciduais maduras de ratas acumulam quantidades significativas de glicogênio, o que confere às mesmas, positividade para reações histoquímicas com reativo de Schiff (TANHOFFER, 2001).

Logo após a ZDS, encontram-se fibroblastos endometriais ainda não totalmente diferenciados em células decíduais maduras, apresentando características morfológicas intermediárias entre fibroblastos e células maduras. Esta região é denominada de Zona de Células Pré-Decíduais (ZPD). Finalmente, a terceira região, constituída por fibroblastos endometriais que não se diferenciaram, Denomina-se Zona de Células Não-Decidualizadas (ZND).

Vários autores relataram que as células decíduais maduras apresentam um importante aumento na quantidade de organelas envolvidas com a síntese e secreção de macromoléculas, incluindo as da matriz extracelular. Tais autores já caracterizaram a síntese e secreção de novos tipos de colágeno, especialmente o tipo V, pelas células decíduais (ZORN et al., 1986; OLIVEIRA et al., 1995; TEODORO, 1995), aumento na síntese e quantidade de ácido hialurônico (CARLSON et al., 1987; ZORN et al., 1995; GRECA et al., 1996), síntese de proteoglicanas intersticiais e associadas ao colágeno (GRECA, 1996; SOARES GRECA et al., 2000) e glicosaminoglicanas sulfatadas (ZORN et al., 1995), além da presença de glicoproteínas estruturais da matriz extracelular, tais como laminina e fibronectina (MURO, 2000). Estudos recentes realizados pelo laboratório de Matriz Extracelular do endométrio de Roedores da Universidade Federal do Paraná, mostraram que a região de células decíduais maduras de camundongos não expressa fibronectina (MURO, 2000; LEÃO, 2002).

1.2 Mecanismos de Absorção, Excreção e Transporte de Zinco nos Tecidos

Modificações na absorção e excreção de Zn no trato gastrointestinal constituem um dos principais mecanismos para manter a homeostase do metal e sua redistribuição tecidual e celular. KING et al. (2000) em seus estudos, demonstraram que os ratos têm capacidade para manter um conteúdo relativamente constante de Zn no organismo, mesmo que o consumo de Zn na dieta possa variar por mais de 10 vezes.

O trato gastrointestinal é o maior sítio de regulação da homeostase do Zn. O mecanismo envolve ajustes na absorção e excreção endógena de íons dentro do conteúdo fecal. A absorção de Zn se faz na mucosa do intestino delgado (ANDREWS & GEISER, 1999). Este processo envolve dois mecanismos, sendo um

por transporte ativo e o outro por transporte passivo. O transporte ativo é saturável para altas concentrações do metal no lúmen intestinal, e sua eficiência aumenta durante períodos de baixa ingestão (SALGUEIRO et al., 2000) ou de deficiência de Zn durante a gravidez (ANDREWS & GEISER, 1999).

Em dietas muito baixas em zinco, a absorção ocorre primariamente por um processo mediado por carreador. A eficiência da absorção se deve a um aumento na taxa de transferência do Zn pelo carreador, através da mucosa intestinal, desde que se estabeleça uma mudança na afinidade do complexo do receptor. O pâncreas exócrino secreta um ligante que intensifica a absorção de Zn no jejuno. Quando o ligante está insaturado com Zn, ele liga o Zn dietético no lúmen do intestino e de certa forma facilita sua absorção. Cogita-se que este ligante possa ser uma metalotioneína (KING et al., 2000). Metalotioneínas intestinais agem como um regulador negativo da absorção de Zn e podem participar no fluxo intestinal de Zn da mucosa para o lúmen (SALGUEIRO et al., 2000).

Existem vários fatores que podem modificar a absorção de Zn e eles podem ser considerados com ativadores ou inibidores deste processo. Dentre os ativadores da absorção, cita-se o ácido pinólico secretado pelo pâncreas, e a vitamina B6, que aumenta secreção de ácido pinólico, citrato e aminoácidos, tais como glicina, histidina, lisina, cisteína e metionina. No grupo dos inibidores existem os ácidos fítico e oxálico, taninos, fibras, selênio e altas concentrações de ferro e cálcio (VALLE & FALCHUK, 1993; SALGUEIRO et al., 2000). Quando o Zn não está sendo consumido na dieta ou o consumo dietético é marginal por longos períodos, ajustes homeostáticos podem ser suficientes evitando um balanço negativo de Zn no organismo (KING et al., 2000).

Vale salientar que o Zn é o mais abundante metal intracelular, sendo encontrado em todos os tecidos, de forma que aproximadamente 85% de todo Zn no corpo é encontrado no músculo e nos ossos. Outros 11% são encontrados na pele e fígado. O remanescente, 2 –3% do Zn total corporal, está presente nos demais tecidos (KING et al., 2000). Aproximadamente 30 a 40% do total de Zn celular está presente no núcleo e aproximadamente 50% está no citoplasma e suas organelas. O restante está presente na membrana celular. Neste caso o íon está ligado a macromoléculas na forma de Zn proteínas/enzimas ou nucleotídeos ácido ribonucléico (RNA) e DNA e correspondendo a apoenzimas (VALLE & FALCHUK, 1993).

Ainda segundo KING et al. (2000), uma deficiência severa de Zn (por exemplo, 0,06 μ mol/d na dieta), faz com que o conteúdo de Zn total no organismo de animais experimentais diminua para aproximadamente 30% quando comparado com controles. No entanto, o autor relata que perdas de Zn não são uniformes sobre todos os tecidos. As concentrações de Zn do cabelo, pele, coração e músculo esquelético permanecem constantes. Contudo, concentrações de Zn no plasma, fígado, osso e testículos diminuem sensivelmente. Perdas renais tendem a ser baixas e também permanecem constantes sobre uma larga amplitude de ingestão. As perdas urinárias variam de 8 a 11 μ mol/d quando a ingestão de Zn é muito baixa. A mudança na excreção urinária de Zn é mediada por ajustes no transporte de Zn tubular renal. Zinco adicional é eliminado diariamente em perdas não tegumentares (por exemplo, suor e outras perdas da superfície), emissão seminal (aproximadamente 9 μ mol de Zn), perdas menstruais e crescimento de cabelo e unha (KING et al, 2000).

O transporte do Zn no sangue é realizado pela albumina. Contudo outros componentes do plasma podem também se ligar ao metal tais como: macroglobulina γ 2, transferrina, cisteína e histidina (VALLE & FALCHUK, 1993; SALGUEIRO et al., 2000). O conteúdo no plasma é aproximadamente 100 μ g Zn/100ml e representa menos de 1% do conteúdo total do organismo (VALLE & FALCHUK, 1993). Ao que parece, a absorção de Zn diminui em condições como gravidez e má-nutrição, com baixas concentrações de albumina plasmática (SALGUEIRO et al., 2000). O fígado parece ter especial função no metabolismo do Zn. Uma vez absorvido, no trato gastrointestinal, o Zn é levado pelo sangue até o fígado onde é depositado ligando-se a uma metalotioneína hepática (SALGUEIRO et al., 2000). Em seguida, o metal é captado no pâncreas, rim e outros tecidos. Desta forma, sugere-se que o fígado seja o principal regulador na transferência e distribuição do Zn pelo organismo (VALLE & FALCHUK, 1993).

Tem sido descrita uma família de transportadores de Zn em superfície celular. Tais carreadores apresentam uma importante função na regulação do metabolismo do íon para nível intracelular. Dentre os transportadores até hoje conhecidos, encontram-se os ZNT 1, ZNT 2, ZNT 3 e ZNT 4 (transportadores 1, 2, 3 e 4 respectivamente). Todos são Zn-específicos e atuam tanto no transporte e fluxo, como no armazenamento vesicular do metal (ANDREWS & GEISER, 1999). A estrutura molecular destes transportadores consiste em seis domínios transmembrana, com uma região intracelular rica em histidina (SALGUEIRO et al.,

2000). O transportador ZNT 1 é amplamente expressado no organismo e funciona como um exportador de Zn. Já foi demonstrada a regulação direta do gene ZNT 1 pela presença de Zn no intestino e fígado de rato, sendo que sua expressão no intestino é influenciada pela ingestão de Zn dietético (ANDREWS & GEISER, 1999). Já o ZNT 2 é expressado no intestino e rins. Suas funções estão envolvidas também como exportador de Zn. O ZNT 2 tem a capacidade de compartimentalizar Zn dentro de vesículas intracelulares (SALGUEIRO et al., 2000). A expressão ZNT 3 é restrita para o cérebro, sugerindo uma importante função para o sistema nervoso central. Este carreador também expressado no testículo. A atividade do transportador ZNT 3 está associada com acondicionamento vesicular de Zn (tal como o ZNT 2) sugerindo seu envolvimento com a espermatogênese. Já o ZNT 4 é expressado na glândula mamária e cérebro. Uma simples mutação pontual no gene ZNT 4 resulta em uma terminação prematura da proteína, suficiente para iniciar uma síndrome letal em ratos. Esta síndrome é caracterizada por uma marcante diminuição do transporte de Zn da glândula mamária para o leite (SALGUEIRO et al, 2000).

1.3 Metalotioneínas, Metabolismo do Zinco e Gestação

A Metalotioneína (MT), é uma proteína identificada como um agente biológico quelante de metal, corresponde a uma proteína citosólica envolvida no metabolismo do Zn (JACOB et al. 1998; SALGUEIRO et al., 2000). Contém sete átomos de Zn ou Cádmio por mol de proteína ligados a cisteína (VALLE & FALCHUK, 1993), sendo a mais abundante proteína intramolecular de ligação do metal (ANDREWS & GEISER, 1999). Dentre suas funções bioquímicas, encontram-se aquelas associadas com detoxificação de metais pesados, varredores de radicais livres, redistribuição do Zn no corpo em infecções agudas e em stress. Ambos autores relataram que as metalotioneínas são proteínas envolvidas nos mecanismos homeostáticos que regulam sua absorção, captação celular, redistribuição entre compartimentos intracelulares e macromoléculas e tão bem como a excreção, atuando na reserva de zinco que pode conferir proteção contra a deficiência deste mineral, sendo o fígado ter função especial no metabolismo.

A MT hepática pode agir como um reservatório de proteção contra a deficiência do metal (VALLE & FALCHUK, 1993; Salgueiro et al., 2000). Isoformas das metalotioneínas 1 e 2 (MT 1 e MT 2) são amplamente expressadas no fígado,

intestino, rim e pâncreas. Sua expressão pode ser induzida por muitos fatores tais como dietas ricas em Zn, interleucinas (IL-1 e IL-6), glicocorticóides, *stress*, dentre outros (VALLE & FALCHUK, 1993; SALGUEIRO et al., 2000). A MT 1 é super expressada no trato reprodutivo durante a gravidez, sendo detectada desde o início da gestação no útero, decídua, placenta e saco vitelínico. Camundongas transgênicas que superexpressam a MT 1, acumulam mais MT-1 e Zn na maioria dos órgãos do que em animais-controle, os quais se protegem contra a Zn deficiência (DALTON et al., 1996).

ANDREWS & GEISER (1999), estudando camundongas homozigotas para genes MT 1 e MT 2 classe *nock out* e camundongas-controle não-transgênicas, recebendo deficiência dietética de Zn severa (1?g/g) a partir do dia 1 de gravidez, concluíram que os efeitos foram embriotóxicos e teratogênicos, e que a maioria dos embriões em ambas as ratas, as deformações tornavam os embriões inviáveis já na metade da gestação. Contudo, 53% dos embriões sobreviventes das camundongas do grupo MT 1 e MT 2 classe *nock out* apresentavam-se morfologicamente anormais quando comparados com apenas 32% dos embriões nas camundongas-controle. Nos experimentos subseqüentes, uma deficiência de Zn dietético moderada (5?g/g começando no 1º dia da gravidez ou 1?g/g Zn dietético começando no 8º dia de gravidez), exerceu efeito teratogênico, mas nenhum efeito embriotóxico. Estes resultados demonstraram que a expressão dos genes MT 1 e MT 2 em fêmeas grávidas melhora o sucesso reprodutivo protegendo o desenvolvimento do embrião contra os efeitos teratogênicos da deficiência moderada de Zn no útero materno. Ainda ANDREWS & GÊISER (1999) observaram em anbos os experimento que a maioria dos sítios de implantação que continham embriões reabsorvidos e muitos dos embriões que permaneceram, estavam mal-formados até o 14º dia de gestação.

JACOB et al. (1998) também observaram que outra proteína potente acceptor de zinco, uma tioneína (T), a qual remove zinco de proteínas e/ou doa para a metalotioneína reciclando o zinco para ser doado a outra metaloproteína, conforme reação abaixo: Zn-doador + T ? Zn-MT ? T + Zn-acceptor

1.4 O Zinco e sua Deficiência nos Eventos da Reprodução

Segundo ANDREWS & GEISER (1999) e SALGUEIRO et al. (2000), o Zn é um dos mais importantes metais na nutrição humana, sendo sua deficiência um

problema nutricional mundial. A primeira manifestação da deficiência de Zn observada em humanos foi descrita no início dos anos 60, por PRASAD (1998). Seu impacto no crescimento e desenvolvimento de recém-nascidos e crianças, além de sua importância em grávidas e idosas, que são considerados os principais grupos de risco, é muito grande, afetando tanto países desenvolvidos e como aqueles em desenvolvimento (MCCALL, 2000; KING, 2000 SALGUEIRO et al., 2000). Estudos realizados nos Estados Unidos da América (EUA), Guatemala, México, Chile, Porto Rico e também no Brasil, mostraram que independentemente da idade, sexo ou raça, a extensão do consumo médio do metal, é de 50 – 80% da necessidade dietética recomendada (SALGUEIRO et al, 2000).

A deficiência de Zn, em mamíferos, é conhecida por se manifestar dentro de um aumento do espectro de efeitos fisiológicos, tais como desordens na pele, no sistema imunológico, afetando tanto a imunidade específica como a não-específica (ANDREWS & GEISER, 1999; SALGUEIRO et al., 2000). Dentre outros efeitos, a carência de Zn parece estar envolvida com o estabelecimento de um quadro de anorexia nervosa em ratas submetidas à redução do consumo de alimento em 50% da quantidade da mesma dieta fornecida a ratas alimentadas com teores adequados em Zn (SALGUEIRO et al., 2000). A carência de Zn também produz efeitos na reprodução, ou seja, afeta a síntese e secreção de hormônio folículo estimulante, diferenciação das gônadas, crescimento testicular, além de afetar a espermatogênese e espermiogênese (ANDREWS & GEISER 1999; Salgueiro et al, 2000). De acordo com VALLE & FALCHUK (1993), ANDREWS & GEISER (1999) e SALGUEIRO et al. (2000), a deficiência de Zn ao longo da gravidez afeta não somente a produção de hormônios, como também uma ampla variedade de enzimas envolvidas nos mecanismos reprodutivos e embrionários. Já é fato concreto a constatação de que a deficiência de Zn apresenta diversos efeitos deletérios em muitos estágios da gravidez.

Dentre as diversas consequências da deficiência de Zn, os estudos relatados por VALLE & FALCHUK (1993), mostraram que embriões de mães deficientes do Zn, desde as fases precoces (como embriões constituídos por 05 células) até a fase de blastocisto, mostraram alterações tanto no tamanho dos blastômeros com degeneração do citoplasma, apresentaram anormalidades da cavidade da blastocela. A taxa de reabsorção dos embriões que sobrevivem até a implantação foi de aproximadamente 30%, enquanto que 90% daqueles que sobreviveram, tornaram-se mal formados e apresentaram peso abaixo do normal. ANDREWS &

GEISER (1999), também relatam que em ratos, durante deficiência na ingestão de Zn, o período de pré-implantação se caracteriza pela morfologia alterada do blastocisto com redução da taxa de sucesso de implantação.

Outros relatos da literatura acerca de deficiência de Zn na gestação mostram malformações esqueléticas, aborto espontâneo, prematuridade ou gestação prolongada, além de complicações durante o parto, como por exemplo, hemorragia excessiva. Segundo HARDING et al. (1988), JANKOWSKI-HENNIG et al. (2000) e Salgueiro et al. (2000), dentre os principais efeitos teratogênicos da deficiência de Zn no organismo materno, citam-se aqueles relacionados com defeitos no tubo neural dos embriões. Segundo VALLE & FALCHUK (1993) e ANDREWS & GEISER (1999), os tipos de malformações embrionárias variam de acordo com o tempo de exposição do feto à deficiência de Zn. A privação precoce do metal já nos primeiros dias da gravidez, concentram mais defeitos na região da cabeça, incluindo olhos, estruturas faciais e sistema nervoso central.

MORGAN et al. (1995), observaram que uma dieta deficiente de Zn (0,5?g de Zn/g de dieta) em ratas grávidas com 19 dias, as fêmeas não ganhavam peso; que 40% não mostraram evidência da implantação e, que nas mesmas, a deficiência promoveu reabsorção de 44% dos seus sítios de implantação observáveis. Segundo os autores, isto ocorreu provavelmente num estágio muito precoce da gestação. O tamanho da ninhada foi reduzido em mais que 40%, sendo que 34% de seus fetos apresentavam alguma teratologia. O peso da prole foi 50% menor que os equivalentes-controle, sendo que ainda houve redução na concentração plasmática do metal, em aproximadamente 70%.

DALTON et al. (1996), em dois experimentos estudando camundongas alimentadas com dieta severamente deficiente em Zn (0,5– 1,5 ?g de Zn/g de dieta), observou que 57% dos embriões implantados haviam desaparecido. A maioria dos embriões que implantaram, apresentavam-se mal-formados até o 14º dia da gravidez. Além disso, dentre os efeitos das deficiências severa de Zn observados já no 1º dia da gravidez em camundongas Zn deficiente, 60% dos embriões implantados tinham desaparecido até o 14º dia de gravidez, enquanto que 55% dos fetos que sobreviveram foram morfologicamente anormais e exibiam defeitos em nível crânio-facial, como também em brotos dos membros e no tubo neural.

No que concerne aos efeitos deletérios da carência de Zn, no nível de alterações celulares, podemos salientar anormalidades tais como, a redução na síntese de proteínas e/ou ácidos nucleicos, polimerização anormal de microtúbulos,

danos secundários causados pela ação de radicais livres, expressão gênica e ciclo celular alterados, com subsequente ação na morfogênese (PETERS et al., 1991). Células fetais Zn-deficientes com alta taxa mitótica, apresentaram alterações na divisão celular, resultando no prejuízo da síntese de DNA, RNA e diferenciação celular, isto atribuído ao bloqueio em diferentes estágios no ciclo celular, com conseqüente prejuízo no crescimento em animais e humanos (HARDING et al., 1988; VALLE & FALCHUK, 1993; MORGAN et al., 1995; DALTON et al., 1996). HARDING et al. (1988), avaliaram os efeitos da deficiência de Zn no desenvolvimento de embriões de 11 dias de vida intra-uterina sob microscopia eletrônica de transmissão. Os autores observaram aumento da morte celular do epitélio do tubo neural, por peroxidação lipídica e ruptura de membranas celulares, incluindo as de mitocôndrias, núcleo, retículo endoplasmático e mesmo a membrana plasmática.

No que se refere a fatores bioquímicos e moleculares, o Zn, no organismo, age como cofator essencial em aproximadamente 300 enzimas e proteínas (VALLE & FALCHUK, 1993; MCCALL et al., 2000; SALGUEIRO et al., 2000). Metaloenzimas dependentes de Zn encontram-se difundidas pelo organismo, desempenhando funções cruciais em muitos processos fisiológicos (ANDREWS & GEISER, 1999; SALGUEIRO et al., 2000), além de exibirem diferentes funções especializadas, envolvendo função catalítica, co-ativa e estrutural (VALLE & FALCHUK, 1993).

LOWE et al. (1999) avaliaram em fêmeas de ratas desmamadas, alimentadas durante 6 semanas com dieta marginalmente deficiente em Zn (contendo 6?g de Zn/g de dieta), e grávidas até o 20º dia da gestação, que estes animais tiveram menor ganho de peso e consumo alimentar. A concentração de Zn no plasma do grupo grávido foi de aproximadamente 75%. Contudo a ausência de anormalidades congênitas observáveis, tais como a esperada redução do número de fetos e do peso fetal médio, mostraram que o fornecimento de Zn materno via placenta é suficiente para suportar o crescimento fetal na deficiência crônica de Zn marginal. Ratas grávidas são capazes de mobilizar Zn para tecidos endometriais e placentários a fim de suportar o crescimento fetal e seu desenvolvimento. Contudo esta situação não se manifesta quando o catabolismo do tecido é induzido por uma redução marcante no consumo alimentar.

JANKOWSKI-HENNIG et al. (2000), avaliando os efeitos da deficiência de Zn no desenvolvimento de embriões para 11 dias, concluíram que as concentrações de Zn plasmática estavam mais baixas e induziram morte celular por apoptose. Parece

que a deficiência de Zn está associada com aumento dos níveis de espécies reativas do oxigênio (R.O.S.) e estresse oxidativo (MORGAN, 1995; DALTON et. al., 1996) dado que excessivo ROS são propostos como um estímulo de iniciação da apoptose.

Finalizando, para que o desenvolvimento embrionário se desenvolva a contento no ambiente uterino, é imperativo que o embrião avance rapidamente ao aporte de circulação materna. As células trofoblásticas, derivadas da camada exterior do blastocisto, são as células capazes de realizar esta tarefa. A invasão do trofoblasto é precisamente regulada espacialmente e temporalmente por hormônios, fatores de crescimento e, principalmente por Metaloproteinases de Matriz Extracelular, as MMPs. As MMPs endometriais são proteases dependentes de Zn secretadas pelas células decíduais e células trofoblásticas, que degradam a matriz extracelular do estroma decidualizado remodelando-o e possibilitando, no útero, a ligação do embrião com a circulação materna para posterior desenvolvimento dos tecidos fetais e placentários (MORGAN et al., 1998).

Como visto na revisão da literatura, vários estudos têm sido desenvolvidos no que concerne à presença de carência de Zn no processo de implantação e seus efeitos em embriões de ratos nas fases iniciais da gestação e ao longo da gravidez normal. Segundo VALLE & FALCHUK. (1993), para que fetos de ratos se desenvolvam satisfatoriamente, há a requisição de até 3% do total do Zn presente no plasma materno. Segundo este mesmo autor, o desenvolvimento de embriões de mamíferos, incluindo humanos, é alterado e sua sobrevivência é colocada em risco quando a ingestão de Zn é reduzida. De acordo com PETERS et al. (1991), a severa deficiência de Zn na dieta materna durante a gravidez, pode ter como consequência um efeito negativo no desenvolvimento embrionário e também no fetal. De acordo com DALTON et al. (1996), durante o período de pré-implantação a deficiência de Zn altera a morfologia do blastocisto e reduz a taxa de sucesso de implantação. Durante o período pós-implantação, a carência causa um aumento na incidência de reabsorção do sítio de implantação e aqueles embriões que sobrevivem, mostram uma alta incidência de anormalidades craniofaciais, brotos dos membros e retardo do crescimento. Uma vez que o Zn tem um papel inequivocadamente importante para o sucesso reprodutivo, o presente estudo visa adicionar informações no que concerne a variações morfológicas ao longo da decídua antimesometrial de ratas, nos dias 6, 7 e 8 da gestação.

2. OBJETIVOS

Com base nas informações contidas na literatura e na proposição levantada, os objetivos deste trabalho foram:

2.1 Geral

Avaliar os efeitos decorrentes da utilização de dieta marginalmente deficiente em Zn nos estágios iniciais da gestação de ratas (dias 6, 7 e 8 da gestação);

2.2 Específicos

1. Avaliar ganho de peso e consumo de ração durante a fase de crescimento e período gestacional;
2. Analisar a concentração plasmática de Zn nos período gestacional;
3. Verificar se a deficiência marginal de Zn altera a taxa de implantação;
4. Verificar, comparativamente entre os dias de gestação determinados, se a deficiência marginal de Zn promove alterações na morfologia decidual.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Laboratório

Os procedimentos deste estudo foram realizados no Laboratório de Matriz Extracelular e Biologia do Endométrio de Roedores, Departamento de Biologia Celular, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

3.2 Animais

Ratas da linhagem Wistar, provenientes do Biotério do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, desmamadas (21 dias) foram distribuídas em dois experimentos. Na primeira etapa, (n 36) os animais foram acondicionados em gaiolas com 3 animais cada. Na segunda etapa, (n 42) foram acondicionados em gaiolas com 1 animal cada, ambas as etapas os animais foram destinadas à obtenção de decídua (acasaladas) e mantidos em ambiente constante fotoperíodo (14 horas de luz e 10 horas de escuro) à temperatura de 21°C.

O esquema para obtenção dos modelos experimentais foi o seguinte:

1ª ETAPA

Grupo 1 (n 18): Dieta Zinco Adequada; sítios de implantação coletados nos dias 6, 7 e 8 da gestação;

Grupo 2 (n 18): Dieta Zinco Deficiente; sítios de implantação coletados nos dias 6, 7 e 8 da gestação.

2ª ETAPA

Grupo 1 (n 24): Dieta Zinco Adequada; sítios de implantação coletados nos dias 6, 7 e 8 da gestação;

Grupo 2 (n 24): Dieta Zinco Deficiente; sítios de implantação coletados nos dias 6, 7 e 8 da gestação.

Uma vez acondicionados, os animais foram tratados com dieta padronizada de acordo com o American Institute of Nutrition e National Research Council conforme REEVES (1997), formulação AIN-93G. O grupo-controle recebeu uma

Dieta Zinco Adequada (DZA) contendo 37?g Zn/g de dieta e o outro grupo tratado recebeu uma Dieta Zinco Marginalmente Deficiente (DZD) contendo 6?g Zn/g de dieta, durante 9 semanas (período de desmame até 80 dias de idade Fase de Crescimento) e permanecendo assim até o período de gravidez (Fase Gestacional), Todos os animais receberam água deionizada *ad libitum* tanto para os controles, como para os tratados.

Para a obtenção de decídua (gestação normal), foram destinados 10 ratos machos adultos com peso entre 300 e 400g, em gaiolas individuais para acasalamento. Os animais foram sacrificados por anestesia profunda, e seus cornos uterinos foram coletados nos dias 6, 7 e 8 da gestação para processamento histológico.

3.3 Controle do Ganho de Peso e Consumo da Ração

Para monitorar o ganho de peso na fase de crescimento, os animais de ambas etapas (agrupados e individualizados) foram pesados 3 dias por semana (2ª feira, 4ª feira e sábado) e durante a fase gestacional (animais grávidos) foram pesados diariamente. Para o consumo de ração durante a 1ª etapa realizada em janeiro à março de 2003, quando os animais estavam agrupados 3 a 3, a quantidade do consumo da dieta foi averiguado semanalmente e feito uma média do consumo por animal. Para a 2ª etapa realizada em abril a julho de 2003 aumentamos o número de animais, visto que, a quantidade de ração adquirida iria sobrar e além de acondicionar os animais 1 por gaiola, também controlamos a ingestão de ração 3 dias por semana (2ª feira, 4ª feira e sábado). O consumo de ração na fase gestacional deu-se diariamente.

3.4 Determinação das Fases do Ciclo Estral

A detecção das fases do ciclo estral foi realizada através de esfregaços vaginais, feitos sempre pela manhã (entre 8 e 9 horas). A caracterização das fases do ciclo baseia-se nos padrões descritos por ALLEN (1922), ou seja: proestro, estro, metaestro e diestro, utilizando-se coloração de Shorr.

3.5 Acasalamento

Ratas virgens, com ciclo estral regular, na fase de estro, foram acondicionadas nas gaiolas com os machos, na proporção de duas para cada um, durante o período noturno. O acasalamento bem sucedido foi confirmado na manhã do dia seguinte pela presença de espermatozóides no esfregaço vaginal, a qual era indicativo de acasalamento e início da gravidez. Sendo assim, consideramos esse dia como o dia 1 da gestação (DE FEO, 1967).

3.6 Coleta dos Sítios de Implantação

O sacrifício dos animais grávidos foi realizado com anestesia profunda a partir das 14 horas dos dias 6, 7 e 8 da gestação. Os cornos uterinos foram coletados na sua totalidade, retirando-se o tecido adiposo excedente. Na sequência, cada corno uterino foi separado dos respectivos ovários. Os sítios de implantação foram seccionados em sentido transversal, fixados e processados para procedimentos de técnica histológica de microscopia de luz.

3.7 Coleta do Sangue e Separação do Plasma

Uma vez os animais anestesiados profundamente, no dias de coleta dos sítios de implantação (6, 7 e 8 dia de gestação), uma punção cardíaca era realizada para a coleta do sangue e este mantido por uma hora em banho maria (36 °C), para a sua coagulação e posterior centrifugação em centrífuga a 5000 rpm por 15 minutos, evitando-se a hemólise das hemácias. As amostras do plasma dos respectivos animais e dias de coleta ficaram mantidas em condições adequadas (-18 °C). As análises foram realizadas para determinar os valores de Zn plasmático pelo método de Espectrometria de Emissão Atômica com Atomização em Chama, no laboratório do LACTEC – Instituto de Tecnologia para o Desenvolvimento, Departamento de Química Aplicada – UTQA.

3.8 Localização dos Sítios de Implantação

Para o dia 6 da gestação (quando os embriões já estão implantados no endométrio), os sítios de implantação ainda não eram observados a olho desarmado como acontece nos dias 7 e 8. Por este motivo, para melhor permitir a dissecação e o isolamento dos sítios, foi utilizada a técnica preconizada por PSYCHOYOS (1960, 1961) e por FINN E MCLAREN (1967), que consiste em injetar na veia da cauda do animal 500 µl do corante Azul de Evans a 0,1% em solução salina. Decorridos vinte minutos, o animal é sacrificado. Os sítios de implantação apareciam, nos cornos uterinos, como faixas azuladas, facilitando a dissecação e coleta do material. Estas faixas se fazem presentes devido ao aumento da permeabilidade vascular que ocorre nos locais de implantação, num mecanismo conhecido como reação de Pontamida (ABRAHAMSOHN E ZORN, 1993).

A partir do dia 7 da gestação, os sítios já apresentam dimensões que permitem sua observação a olho desarmado.

3.9 Metodologia para Microscopia de Luz

Para a fixação, secções transversais dos cornos uterinos contendo os sítios de implantação, foram imersos em solução fixadora. A fixação procedeu-se de acordo com o seguinte protocolo:

Fixação em Paraformaldeído 2% em PBS 0,1 M pH 7,4 por 16 Horas temperatura 4 °C

Desidratação em etanol 70% 30 minutos em Temperatura Ambiente (T.A.);

Desidratação em etanol 80% 30 minutos em T.A.;

Desidratação em etanol 95% 30 minutos em T.A.;

Desidratação em etanol 100% I 30 minutos em T.A.;

Desidratação em etanol 100% II 30 minutos em T.A.;

Diafanização em etanol absoluto / xileno – (1:1) 2 horas;

Diafanização em xileno - 2 x 15 minutos em T.A.;

Impregnação em parafina - 2 horas 30 minutos - 56°C;

Emblocagem em parafina Histosec.

A microtomia de todo o material foi realizada em micrótomo de parafina para obtenção de cortes transversais de 5 µm de espessura.

3.10 Técnicas de Coloração

3.10.1 Hematoxilina-Eosina

Esta técnica de coloração histológica foi utilizada para detectar possíveis alterações morfológicas na estrutura da decídua em decorrência da deficiência marginal de zinco.

Os cortes rehidratados permaneceram imersos por 1 minuto na solução de hematoxilina, sendo em seguida mantidos em água corrente por 10 minutos para a viragem. Logo após mergulharam-se os cortes em eosina por 1 a 5 minutos. Em seguida, realizou-se a desidratação, diafanização e montagem da lâmina com Entellan (BEÇAK, 1970).

3.11 Análise Morfométrica

As análises morfométricas foram realizadas através do programa UTHSSCA Image Tool for Windows versão 2.02. O Image Tool é um programa de análise de processamento de imagem para o Microsoft Windows 95 TM ou Windows NT TM. As funções de análise incluem mensurações dimensionais (distância, ângulo, perímetro, área) e mensurações em escala de cinza (ponto, linha e histograma de área com estatística).

3.12 Análise Estatística

Para as análises dos dados foram utilizadas os testes; “F” para comparação de Desvio Padrão e “t” para comparação de médias.

4. RESULTADOS

Para a análise dos resultados, dividi-se as observações em três partes. A primeira trata da descrição considerando os dados coletados, tais como ganho de peso (nas fases de crescimento e gestacional) e consumo da ração (também nas fases de crescimento e na fase da gestação). A segunda parte, mostra os resultados da dosagem do zinco plasmático e a terceira parte trata das análises histológicas dos sítios de implantação das ratas, comparando os dias 6, 7 e 8 da gestação. Em ambas as análises sempre foi feita a comparação entre os grupos de animais de acordo com o modelo experimental adotado, ou seja, comparação entre os animais tratados com padrão AIN-93G (REEVES, 1997) Zinco Adequada (Dieta Zinco Adequada – DZA) contendo 37 mg de Zn/g de ração e dos animais tratados seguindo dieta marginalmente-deficiente (Dieta Zinco Deficiente – DZD), padrão AIN-93G, porém modificada de acordo com Lowe (1999) contendo 6 mg de Zn/g de ração.

4.1 Ganho de Peso

4.1.1 Fase de crescimento

Após o desmame (21 dias), todos os animais receberam dieta durante as 9 semanas seguintes até idade ideal para a reprodução (cerca de 02 meses de idade). Foram avaliados dois parâmetros de peso dos animais para ambos os grupos. O primeiro, ganho de peso final para o grupo que recebeu a DZA, este ganhou 228,8 ± 22,9g e o grupo da DZD 227,0 ± 16,2g. O segundo, foi o ganho de peso médio (peso final menos peso inicial), nos animais os quais receberam a DZA ganharam em média 183,5 ± 21,0g; enquanto que aqueles com DZD ganharam em média 184,0 ± 16,2g. Como pode ser observado, ambos os resultados não apresentam diferença estatística significativa.

O gráfico 1 mostra a evolução do ganho de peso médio no período de crescimento, durante esta fase, que compreendeu 60 dias. Neste momento, foram coletados 24 pontos de peso. A análise estatística foi feita ponto a ponto e verificou-se que não houve diferença estatística para ambas as dietas.

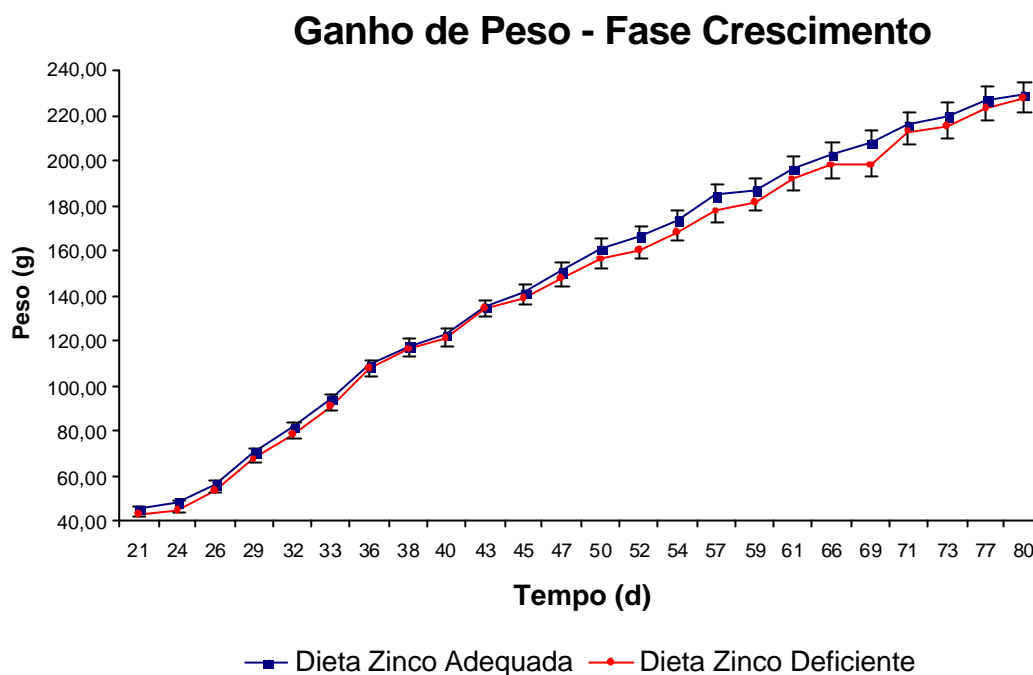


Gráfico 1 – Ganho de peso no período de crescimento em ratas alimentadas com Dieta Zinco Adequada (77g Zn/g) e Dieta Zinco Marginalmente Deficiente (67g Zn/g) do desmame até 80 dias de idade. Os pontos representam a média \pm DP, n = 42. P > 0,05.

4.1.2 Fase de gestação (Dias 6, 7 e 8)

Após a fase de crescimento, as ratas foram acasaladas e, uma vez constatada a presença de espermatozóides no esfregaço vaginal (o indicativo de que houve acasalamento e início da gestação), passaram a ser pesadas diariamente. Com os dados de peso obtidos, foi realizado o teste “t” realizado para os animais nos dias 6, 7 e 8 da gestação.

4.1.2.1 Período de 6 dias de gestação

Dos animais acompanhados nos 6 primeiros dias de gestação, 22 consumiram a dieta DZA, enquanto que 17 utilizaram a dieta DZD. O ganho de peso final para os animais neste período também não foi estatisticamente significativo. O grupo controle (DZA), apresentou peso médio de $255,3 \pm 20,0$ g, enquanto que grupo tratado (DZD) apresentou $246,4 \pm 17,2$ g. O ganho de peso médio (peso final menos peso inicial) para os animais com dieta zinco adequada foi $12 \pm 4,4$ g, enquanto que

aqueles com dieta zinco deficiente foi de $8,6 \pm 7,6$ g no período. A análise estatística não apresentou diferença significativa para $P > 0,05$.

O gráfico 2, representa o acompanhamento do peso médio dos animais ao longo dos 6 dias de gestação.

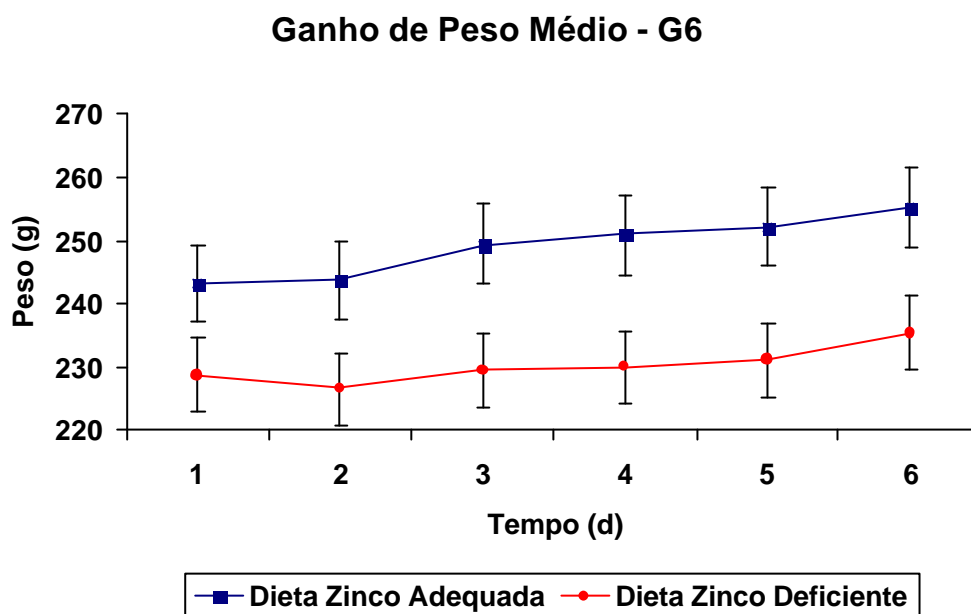


Gráfico 2 – Ganho de peso durante o período de 6 dias de gestação em ratas tratadas com Dieta Zinco Adequada (37 ± 7 g Zn/g) ($n = 22$) e Dieta Zinco Marginalmente Deficiente (6 ± 7 g Zn/g) ($n = 17$). Os pontos representam a média \pm DP, $P > 0,05$.

4.1.2.2 Período de 7 dias de gestação

Para este dia, foram avaliados 16 animais para o grupo controle (DZA) e 09 para o grupo tratado (DZD). O ganho de peso final do grupo DZA foi de $260,1 \pm 19,6$ g, enquanto que o do grupo DZD foi $259,6 \pm 9,0$ g. O ganho de peso médio (peso final menos inicial) durante o período de 7 dias de gestação para o grupo DZA foi $15,6 \pm 7,3$ g e do grupo DZD foi $13,7 \pm 4,8$ g. Portanto, não foi observada diferença significativa quanto o peso final e médio para o dia 7 da dieta adequada comparados com a da dieta deficiente, sem apresentar diferenças estatísticas para o ganho de peso no período.

O gráfico 3 faz o acompanhamento de todos os animais nos 7 dias de gestação.

Ganho Peso Médio - Animais G7

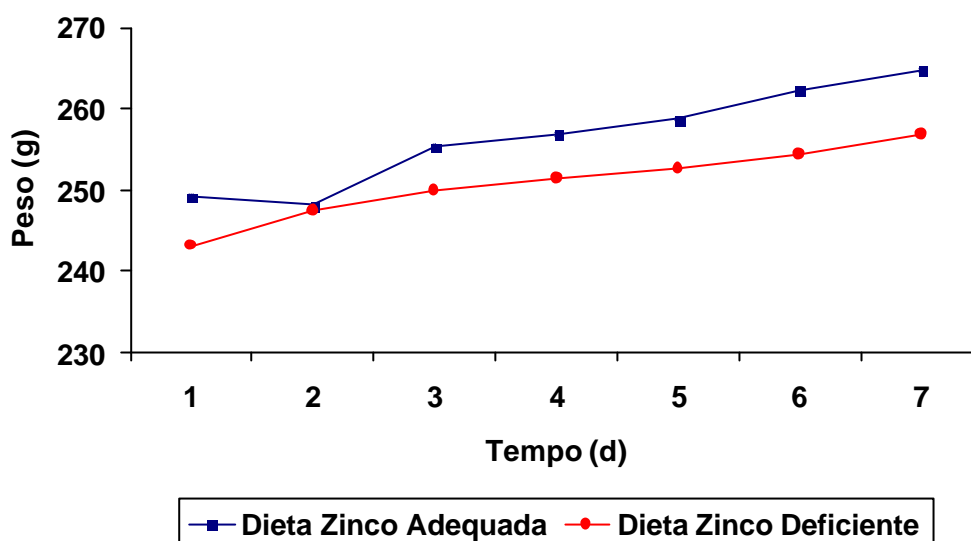


Gráfico 3 – Ganho de peso durante o período 07 dias de gravidez em ratas alimentadas com Dieta Zinco Adequada (37?g Zn/g) n = 16 e Dieta Zinco Marginalmente Deficiente (6?g Zn/g). n = 09. P > 0,05.

4.1.2.3 Período de 8 dias de gestação

Neste dia, foram avaliados 05 animais para o grupo controle (DZA) e 03 para o grupo tratado (DZD). O ganho de peso final do grupo DZA foi de 253,8 ? 28,2g, enquanto que o do grupo DZD foi 266,0 ? 6,9g. O ganho de peso médio (peso final menos inicial) durante o período de 8 dias de gestação para o grupo DZA foi 17,5 ? 4,6g e do grupo DZD foi 14,3 ? 3,1g. Não foram observadas diferenças significativas quanto ao ganho de peso final e para o ganho de peso no período.

O gráfico 4 faz o acompanhamento de todos os animais nos 8 dias de gestação.

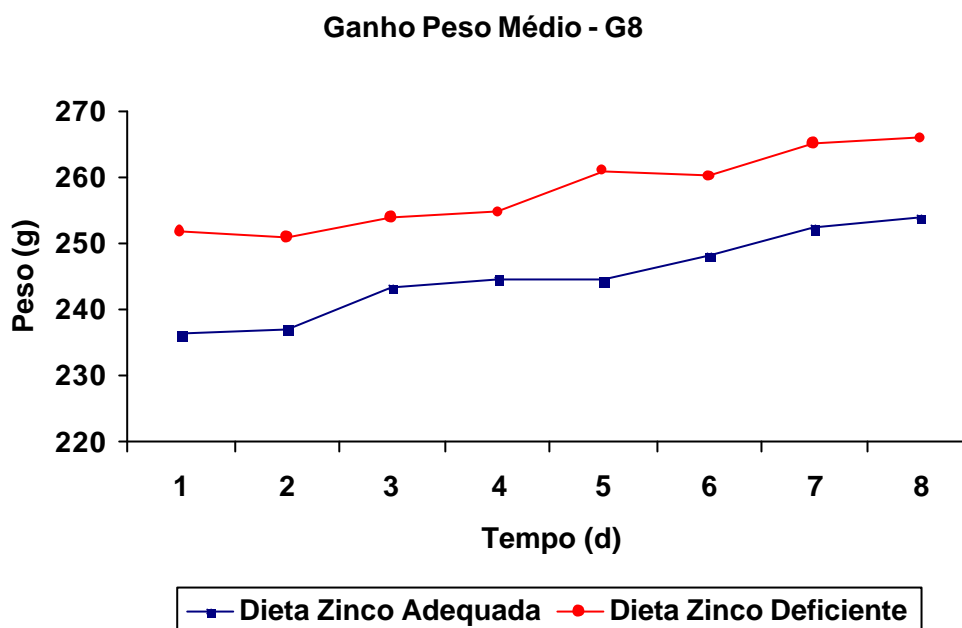


Gráfico 4 – Ganho de peso durante o período 08 dias de gravidez em ratas alimentadas com Dieta Zinco Adequada (37?g Zn/g) n = 05 e Dieta Zinco Marginalmente Deficiente (6?g Zn/g). n = 03. P > 0,05.

4.2 Consumo de Ração

4.2.1 Fase de crescimento

4.2.1.1 Animais agrupados

Na primeira etapa do experimento, ainda na fase de crescimento, os animais de cada grupo foram acondicionados em 3 animais em cada gaiola. O consumo de ração foi verificado em 9 períodos do tratamento. O consumo médio de ração para o período foi de 12,2 ? 2,0g para o grupo com DZA e 11,7 ? 1,6 para o grupo com DZD, dados que não apresentaram diferença estatística. O gráfico 5 acompanha o consumo médio de ração durante o período e apenas no 77º dia de vida verificou-se diferença estatística significativa para o consumo de ração.

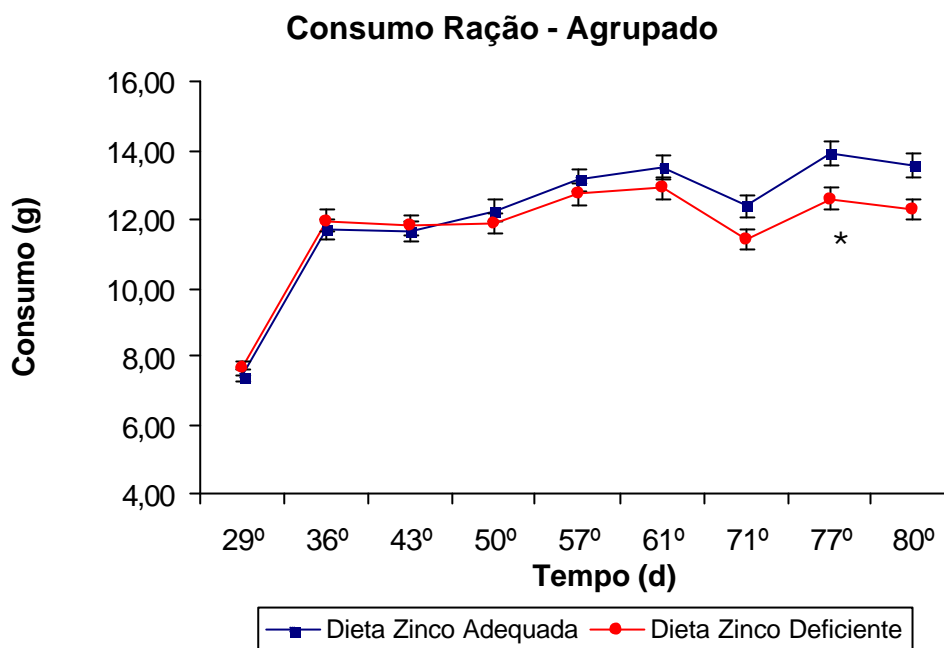


Gráfico 5 – Consumo médio de ração animais agrupados - período de crescimento – em ratas alimentadas com Dieta Zinco Adequada (37?g Zn/g) e Dieta Zinco Marginalmente Deficiente (6?g Zn/g) do desmame até 80 dias de idade. Os pontos representam a média ? DP, n = 18. *Diferença significativa para o grupo DZA, P < 0,05.

4.2.1.2 Animais individualizados

Na segunda etapa, os animais ainda na fase de crescimento, foram acondicionados individualmente. O consumo médio de ração foi de 11,6 ? 2,6 g para o grupo com DZA, enquanto que para os animais com DZD 11,9 ? 2,9g, observando-se que não há diferenças entre os dados.

O gráfico 6 mostra o acompanhamento diário do consumo médio entre as duas rações com dietas diferentes. Pode-se notar que existe uma grande alternância no consumo desde o início do tratamento até o final. A análise estatística realizada ponto a ponto da ingestão de ração mostra diferença estatística em 3 pontos da curva, no 25º, 74º e 80º dia, o consumo de ração apresentou tal diferença.

Pode-se constatar que o consumo da ração foi oscilante, em relação à quantidade ingerida. Houve uma redução do consumo entre o 44º dia até o 50º e, retomada da alimentação no 52º dia e superior a média do 54º dia. A partir do 62º dia os animais com DZD tiveram, na média, um consumo maior de ração. No 80º dia de coleta de dados, a quantidade ingerida de ração para a DZA foi de 14,1 ? 2,3g,

enquanto que para os animais com DZD, o consumo foi de $15,8 \pm 1,8$ g apresentando diferença estatística.

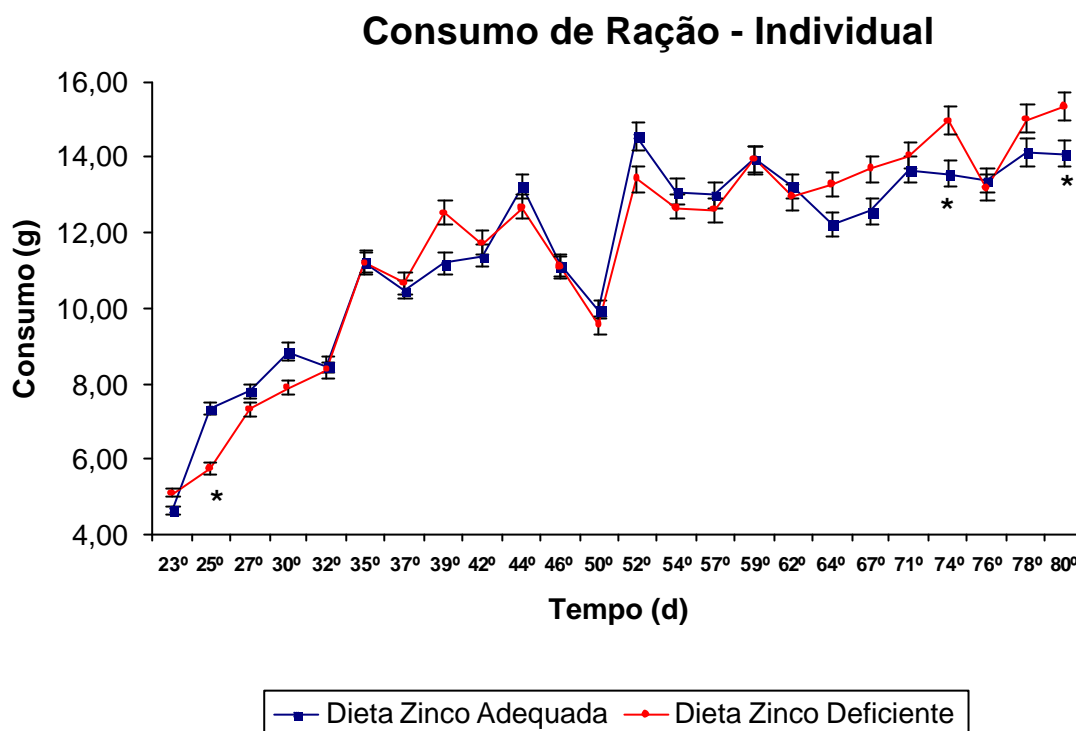


Gráfico 6 – Consumo médio de ração animais individualizados - período de crescimento – em ratas alimentadas com Dieta Zinco Adequada (37 ± 7 g Zn/g) e Dieta Zinco Marginalmente Deficiente (6 ± 7 g Zn/g) do desmame até 80 dias de idade. Os pontos representam a média \pm DP, n = 24 . *Diferença significativa para o grupo DZA, P < 0,05.

4.2.2 Consumo de Ração durante a Gestação

O consumo de ração foi avaliado para os períodos de gestação. Do dia 1 da gestação até o dia 6, um grupo de 22 animais recebeu a DZA e, enquanto que 15 animais receberam a DZD. O consumo médio para aqueles com dieta padrão (DZA) foi de $14,3 \pm 2,0$ g, sendo que os com dieta controle o consumo foi de $13,3 \pm 2,5$ g.

Já para os animais monitorados até o dia 7 da gestação, o grupo foi reduzido para 16 animais com DZA e 07 com DZD. Constatou-se um consumo médio de $14,4 \pm 2,3$ g para a DZA e $14,1 \pm 1,2$ g para a DZD. Os animais que foram até o dia 8 da gestação observamos que a quantidade de ração consumida pelo grupo DZA foi menor que o consumido pelo grupo DZD, a quantidade ingerida foi de $14,9 \pm 3,9$ g e $15,1 \pm 1,3$ g respectivamente para os grupos. Mas em ambos os dias não foram verificadas diferenças estatísticas para o consumo médio da ração.

O gráfico 7, 8 e o 9 mostram respectivamente a evolução do o consumo diário para os animais até o dia 6, até o dia 7 e até o dia 8 da gestação. Pode-se perceber, que o consumo não difere drasticamente ao longo do tempo e em nenhum ponto foi observada diferença estatística.

Consumo Ração - G6

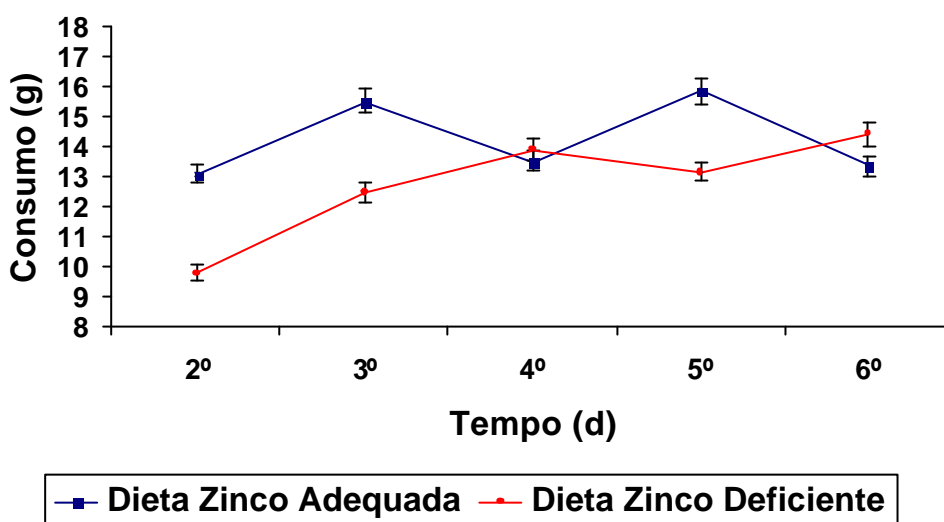


Gráfico 7 – Consumo de ração durante o período de gravidez até o dia 6, em ratas alimentadas com Dieta Zinco Adequada (37?g Zn/g) n = 22 e Dieta Zinco Marginalmente Deficiente (6?g Zn/g) n = 15. P > 0,05.

Consumo de Ração - G7

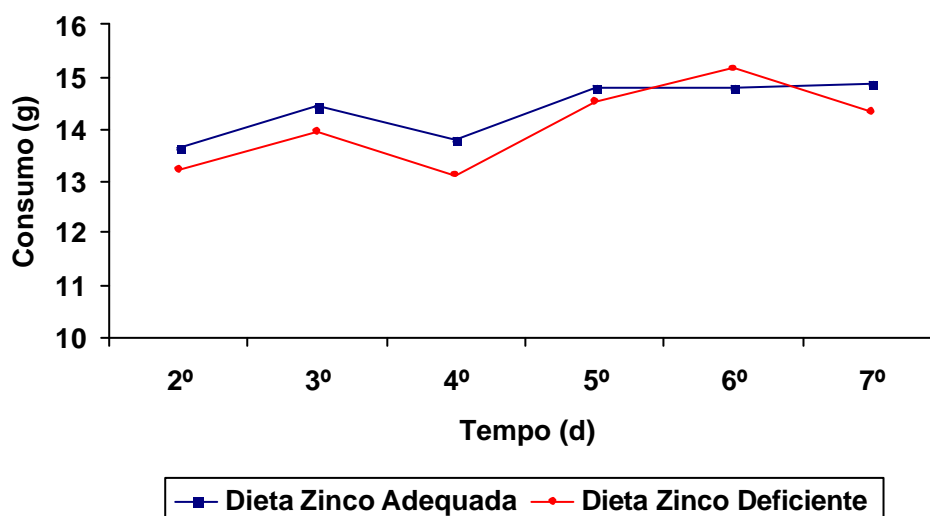


Gráfico 8 – Consumo de ração durante o período de gravidez até o dia 7 em ratas alimentadas com Dieta Zinco Adequada (37?g Zn/g) n = 16 e Dieta Zinco Marginalmente Deficiente (6?g Zn/g) n = 07. P > 0,05.

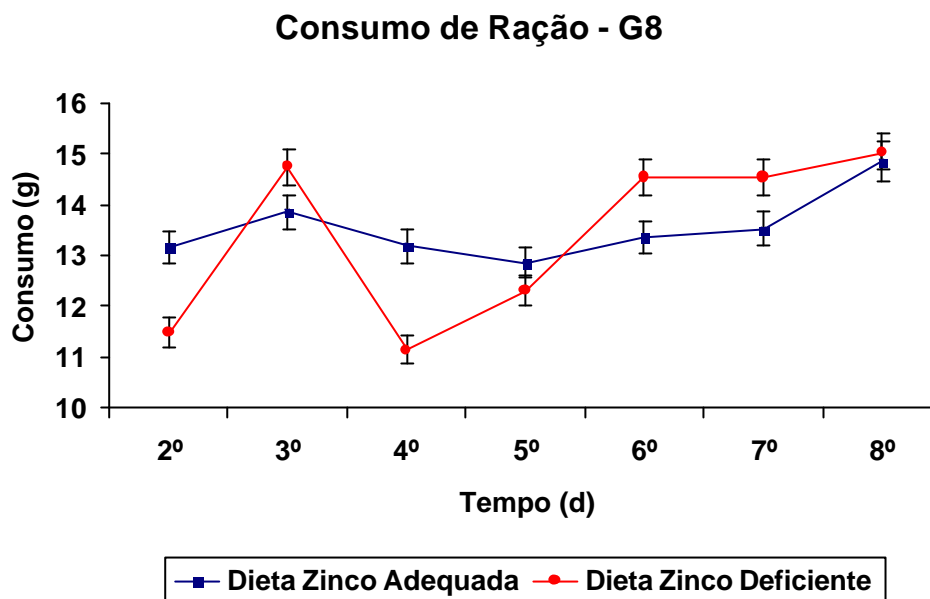


Gráfico 9 – Consumo de ração durante o período de gravidez até o dia 8 em ratas alimentadas com Dieta Zinco Adequada (37?g Zn/g) n = 05 e Dieta Zinco Marginalmente Deficiente (6?g Zn/g) n = 03. P > 0,05.

4.3 Concentração Plasmática de Zinco

O gráfico 10 mostra que na concentração plasmática de zinco ocorre uma queda com o passar da gravidez. No 6º dia de gravidez, as concentrações foram de 216 ? 53,4 µmol/L e 197,0 ? 35,1 µmol/L; no 7º dia, os valores 196,3 ? 26,3 µmol/L e 206,5 ? 54,1 µmol/L e no 8º dia, obtivemos 156,0 ? 19,9 µmol/L e 173,4 ? 35,3 µmol/L, ambos resultados respectivos para DZA e DZD. O animais com dieta DZD apresentaram uma maior concentração de zinco plasmático para o 7º e 8º de gravidez, mas na análise estatística dos dados não foi observada diferença estatística.

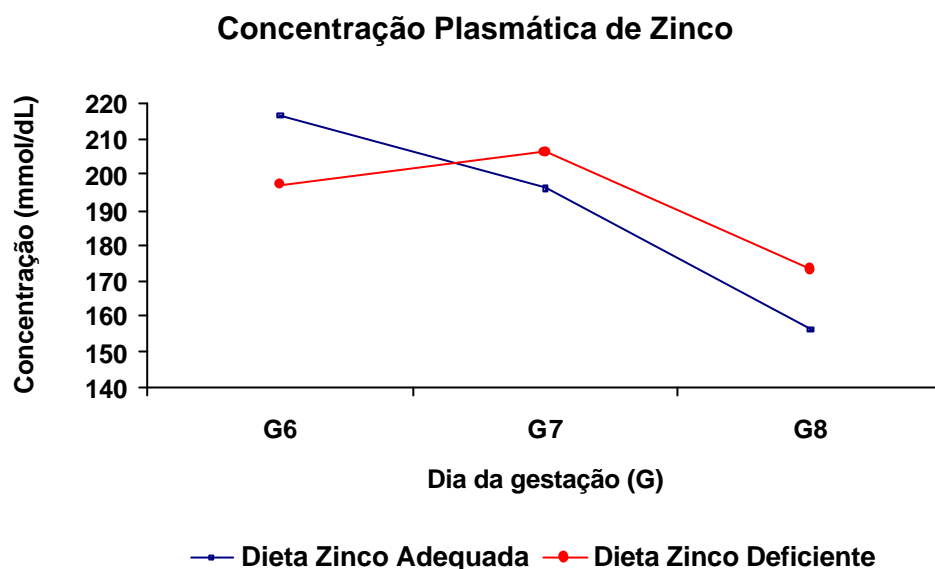


Gráfico 10 – Concentração Plasmática de Zinco em ratas alimentadas com Dieta Zinco Adequada (37?g Zn/g) e Dieta Zinco Marginalmente Deficiente (6?g Zn/g) $P > 0,05$.

4.4 Número de Sítios de Implantação

Como descrito no capítulo Material e Métodos, os animais grávidos nos dias 6, 7 e 8 da gestação de ambos os grupos experimentais, foram sacrificados e os cornos uterinos coletados. De cada corno foram retirados e contados os sítios de implantação. A média do número de sítios de implantação por animal (nos 03 dias de gestação estudados) foi a seguinte: o grupo com DZA apresentou número médio de $11,2 \pm 1,8$ sítios, enquanto que a média do grupo com DZD foi de $10,3 \pm 1,7$ (vide Gráfico 11). Sob o ponto de vista estatístico não houve diferença entre os grupos DZA e DZD.

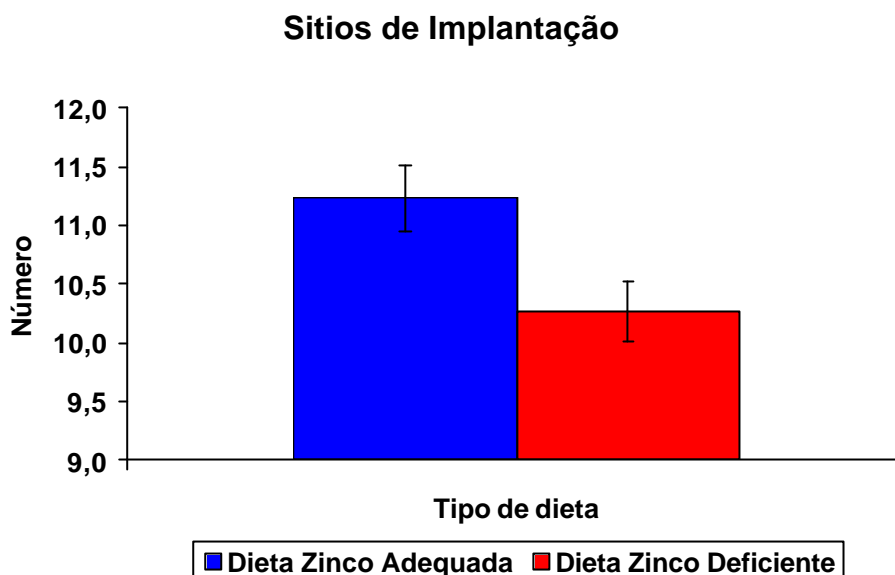


Gráfico 11 – Número de sítios de implantação em ratas alimentadas com Dieta Zinco Adequada (37?g Zn/g) e Dieta Zinco Marginalmente Deficiente (6?g Zn/g). $P > 0,05$.

4.5 Análises Histológicas dos Sítios de Implantação

Também como descrito no capítulo Material e Métodos, os sítios de implantação foram submetidos a processamento histotécnico, com fixação em solução de Paraformaldeído a 2% em PBS a 0,1M pH 7,4, seguindo protocolo rotineiro para inclusão em parafina. Para a microtomia, fizemos cortes transversais de 5 μ m dos sítios de implantação para cada dia de gestação. Em todos os cortes observados, o endométrio dos sítios de implantação apresentou-se constituído pela decídua antimesometrial (envolvida com o processo de implantação do blastocisto). A decídua antimesometrial era formada por três regiões distintas, sendo que a região ou zona de células deciduais maduras (ZDM), estava localizada nas imediações da câmara de implantação. Esta zona aumentava a sua área à medida que a gestação progredia, de forma que a ZDM dos sítios de implantação do dia 8 era bem maior que a dos sítios do dia 6.

A área da decídua antimesometrial situada após a ZDM, era formada pelas células pré-deciduais, com características intermediárias entre fibroblastos endometriais e células deciduais maduras, denominada de ZPD (zona de células pré-deciduais). A ZPD numa situação oposta a ZDM, apresentava redução de área no progresso da gestação, sendo o mesmo observado na ZND (a zona de células

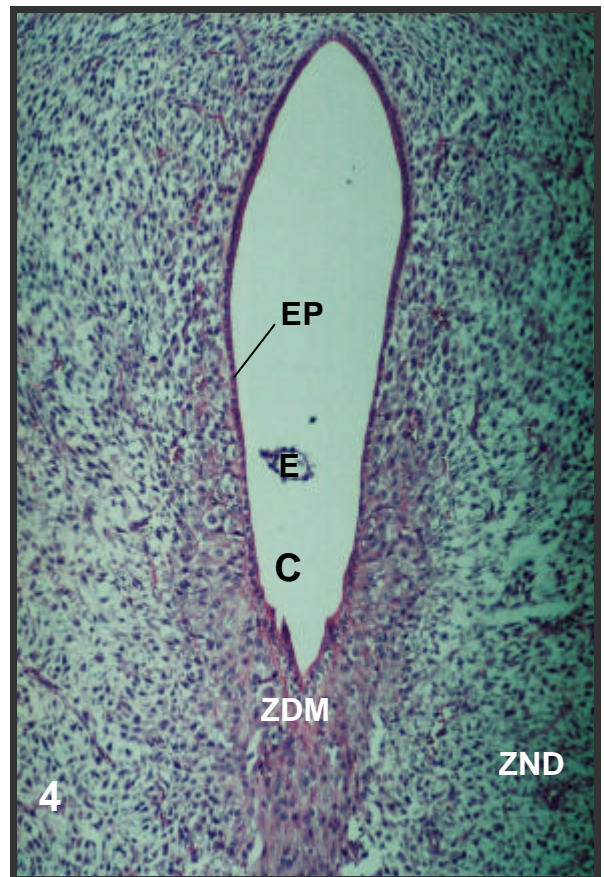
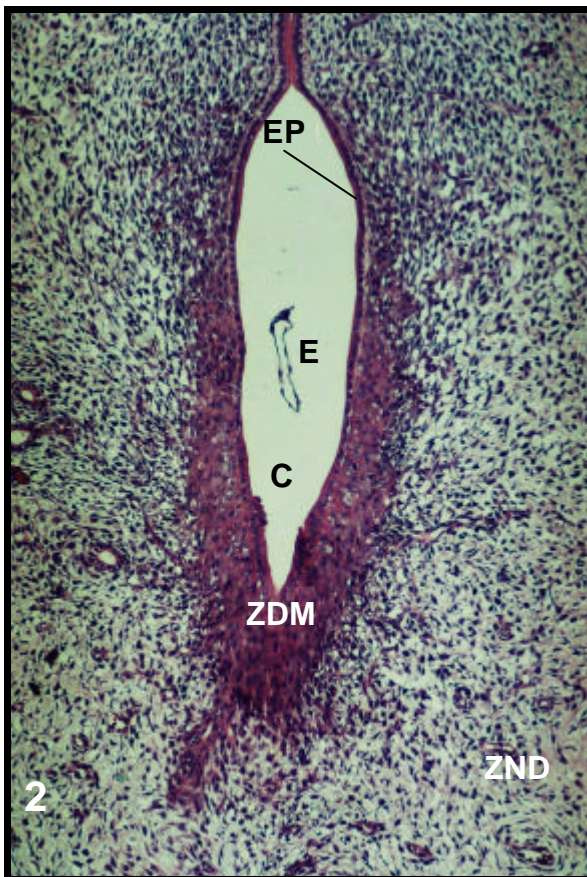
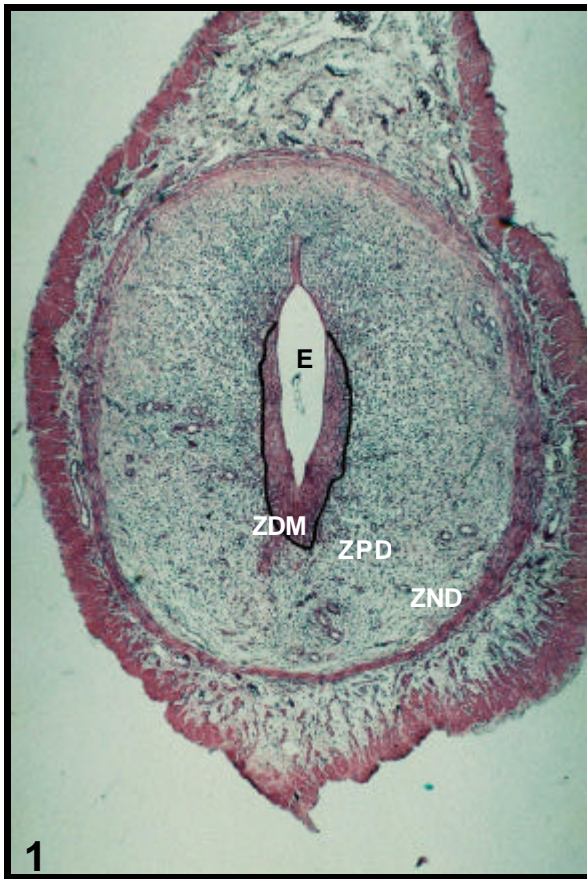
não-decidualizadas), constituída por fibroblastos endometriais. A ZND estava localizada nas vizinhanças do miométrio.

4.5.1 Dia 6 da gestação

No dia 6 da gestação, o epitélio da cripta uterina estava íntegro e os embriões não estavam aderidos (possivelmente devido a artefatos da técnica histológica). Entretanto, o processo de decidualização havia ocorrido. A Zona Decidual Madura (ZDM) está bem evidenciada pela coloração e não encontramos separação entre as sub-regiões de células decidualizadas da ZDM conhecida como Zona Decidual Primária (ZDP) e a Zona Decidual Secundária (ZDS). Não havia distinção entre a Zona Pré-decidual (ZPD) e a Zona Não-Decidualizada (ZND).

A ZDM apresentava grandes células deciduais maduras poliédricas, com um ou mais núcleos evidentes (fibroblastos endometriais diferenciados) e justapostas com a presença de pouca ou nenhuma matriz extracelular. A ZPD, apresentava células com características intermediárias, com espaços intercelulares mais amplos e células deciduais ainda em diferenciação. A ZND era a região mais desenvolvida neste dia da gestação, sendo formada por fibroblastos endometriais e amplos espaços intercelulares. Era freqüente a presença de glândulas endometriais e muitos vasos sanguíneos, especialmente capilares e vênulas.

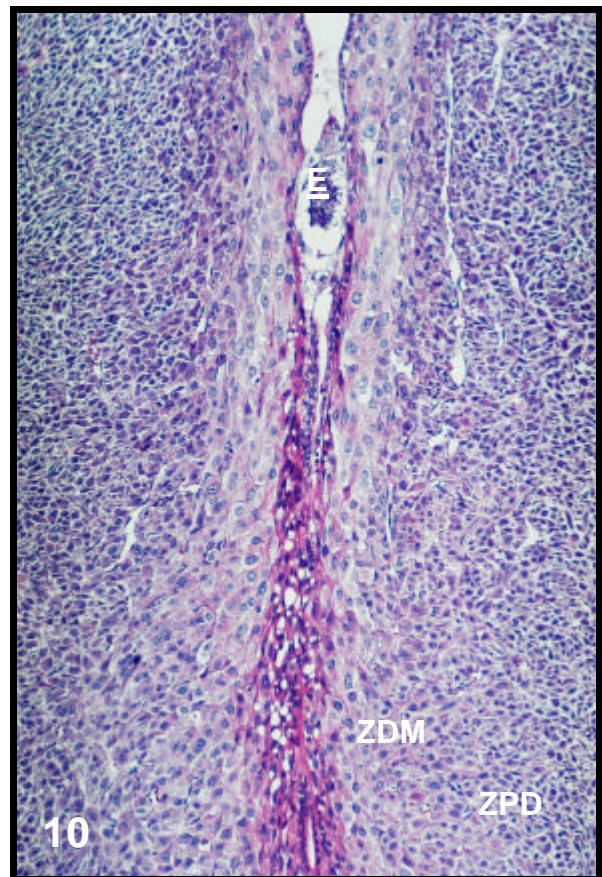
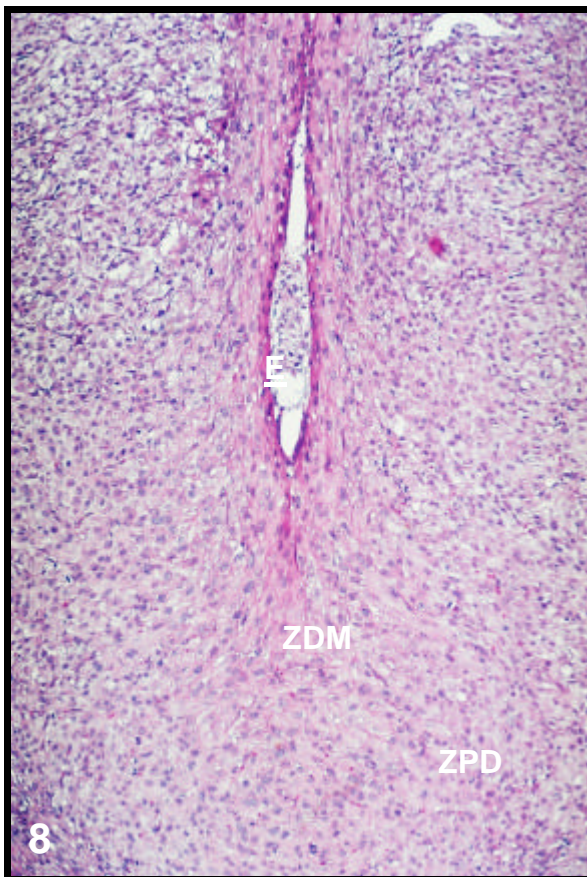
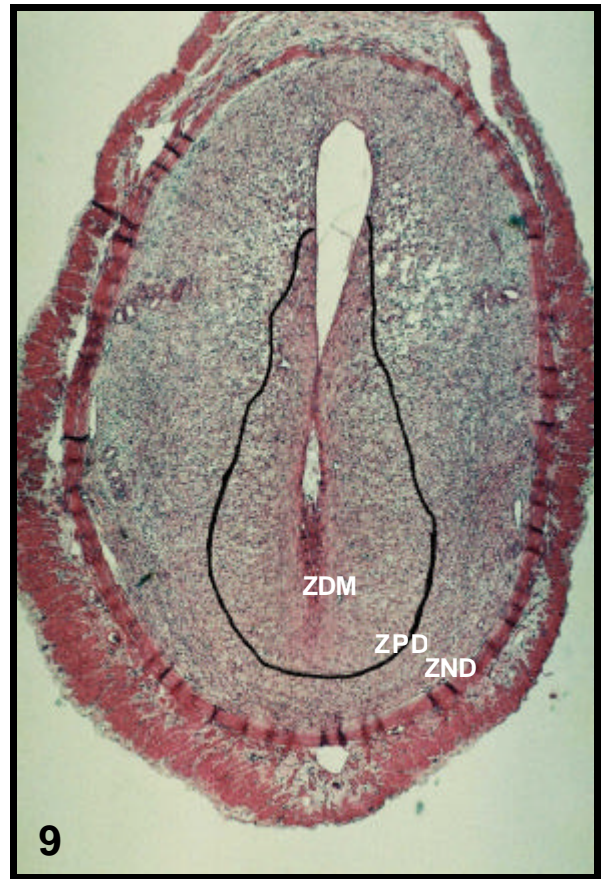
Ao se comparar os cortes de sítios de implantação dos animais do grupo DZA (Figuras 1 e 2) com os do grupo DZD (Figuras 3 e 4), notou-se inexistência de diferenças importantes, especialmente com relação à análise morfométrica do comprimento e da área da ZDM. O comprimento da ZDM dos animais que consumiram a DZA apresentavam $203 \pm 12 \mu\text{m}$ e os da DZD $175 \pm 41 \mu\text{m}$. A área da ZDM para a dieta controle foi de $1240 \pm 345 \mu\text{m}^2$ e para a dieta tratada $1154 \pm 373 \mu\text{m}^2$. Observamos que, tanto o comprimento como a área da ZDM foram maiores nas ratas alimentadas com a DZA quando comparadas com a DZD, porém a análise estatística não apresentou diferença significativa.

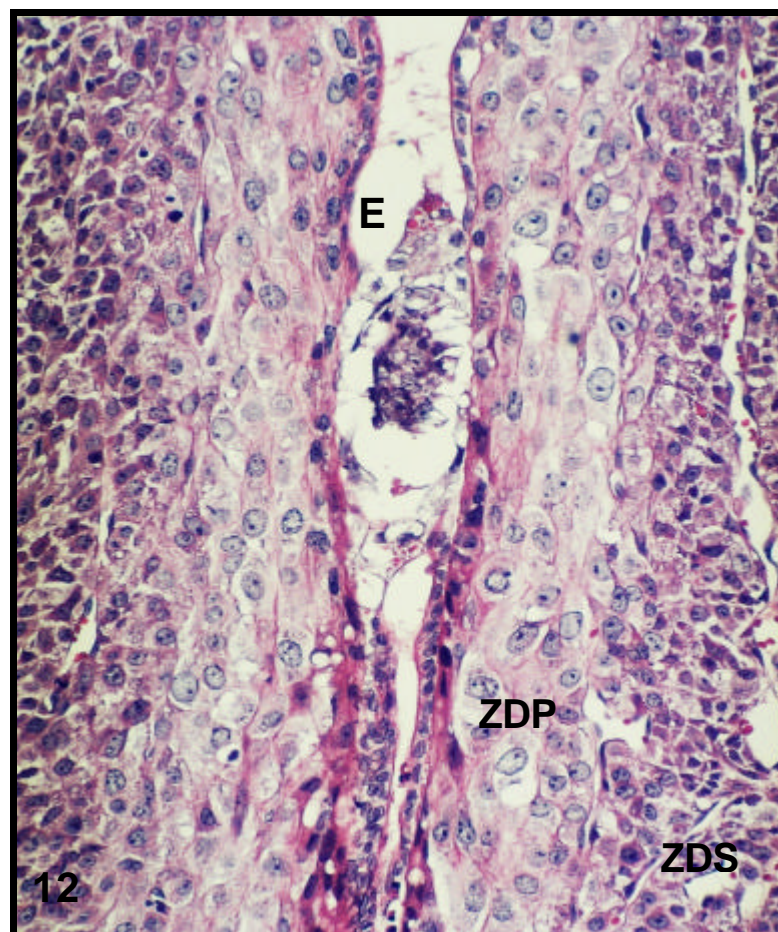
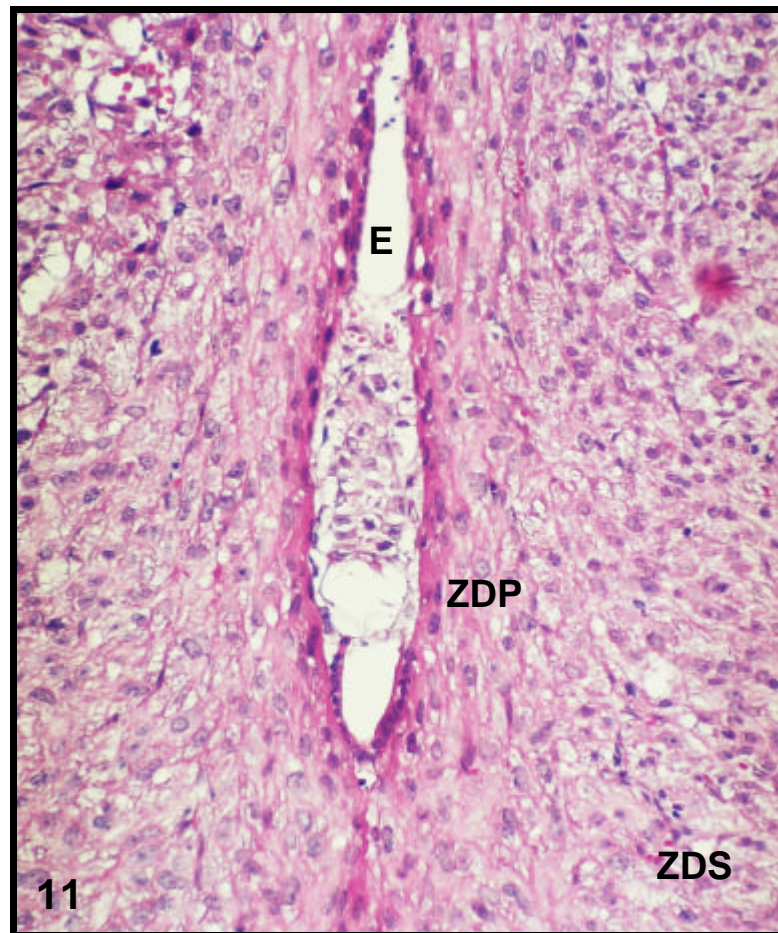




4.5.2 Dia 7 da gestação

No dia 7 da gestação, a cripta uterina estava fechada, formando a câmara de implantação. A morfologia do embrião apresentava-se normal e notamos a presença de células trofoblásticas responsáveis pelo processo de degeneração do epitélio uterino no processo de implantação. Na Zona Decidual Madura (ZDM) estava evidenciada pela presença de grandes células deciduais poliédricas. Neste dia da gestação observamos a presença das 02 sub-regiões da ZDM, conhecidas como Zona Decidual Primária (ZDP), próxima ao epitélio, e uma segunda região conhecida como Zona Decidual Secundária (ZDS). O aumento de área da ZDM era evidente comparado com o dia anterior em decorrência do processo de decidualização com a presença de células deciduais em contigüidade, com quase completa ausência de matriz extracelular. A separação entre as ZDM e ZPD não era evidente. A ZPD apresentava-se como uma região intermediária contendo fibroblastos decidualizados e não-decidualizados, mas esta região é menor em área do que a equivalente do dia anterior. A Zona Não-decidualizada (ZND) estava bem mais reduzida, permanecendo mais próxima ao miométrio. Era formada por fibroblastos endometriais com grandes espaços intercelulares e glândulas uterinas (Figuras 7 e 8). Comparando-se os cortes dos animais que receberam a DZA com a DZD, notou-se que o endométrio das fêmeas-DZA apresentava tamanho, implantação e degradação do epitélio maiores, comparado com o endométrio das fêmeas-DZD. Ao que parece a câmara de implantação dos animais-DZD, estava reduzida em relação à dos animais-DZA (Figura 9 e 10). Quando comparadas com aumentos maiores (Figuras 11 e 12) a ZDM dos animais-DZA apresentava uma região decidual primária mais evidente do que a dos animais-DZD. Na mesma figura caracterizamos ainda uma camada de células trofoblásticas mais evidente nos animais-DZA. Estes resultados indicam que a deficiência de zinco pode promover alteração no processo de implantação. As análises morfométricas dos sítios de implantação comprovam estas evidências quando verificou-se que o comprimento da ZDM para os animais-DZA apresentavam $223 \pm 27 \mu\text{m}$ e, para aqueles que receberam dieta DZD tinham $203 \pm 11 \mu\text{m}$. Neste caso, foi observado diferença estatística. Já a área da ZDM para os animais que receberam a DZA era de $3197 \pm 631 \mu\text{m}^2$ e para aqueles animais com DZD era de $2573 \pm 241 \mu\text{m}^2$. Observa-se então que, tanto o comprimento como a área da ZDM era menor para aqueles animais que receberam a DZD. Mas a análise estatística não apresentou diferença significativa.

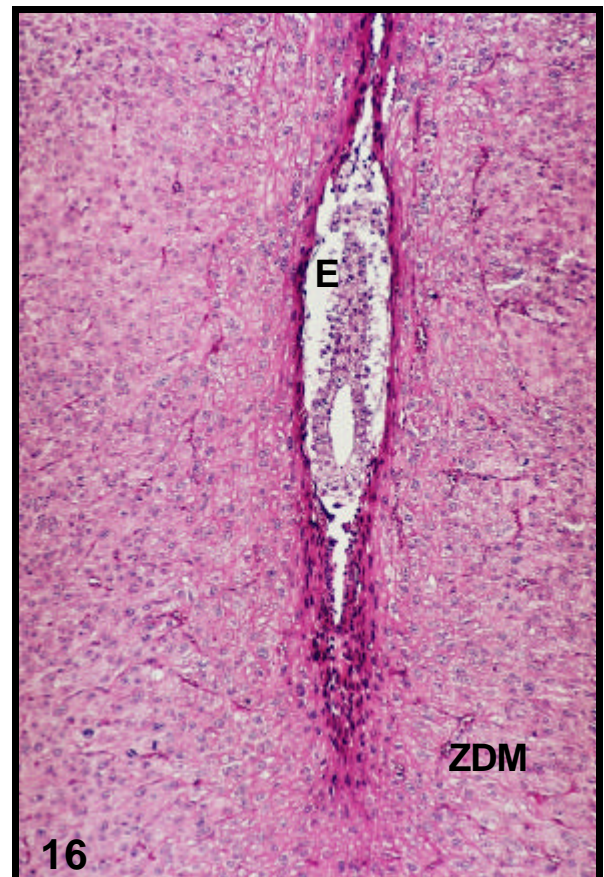
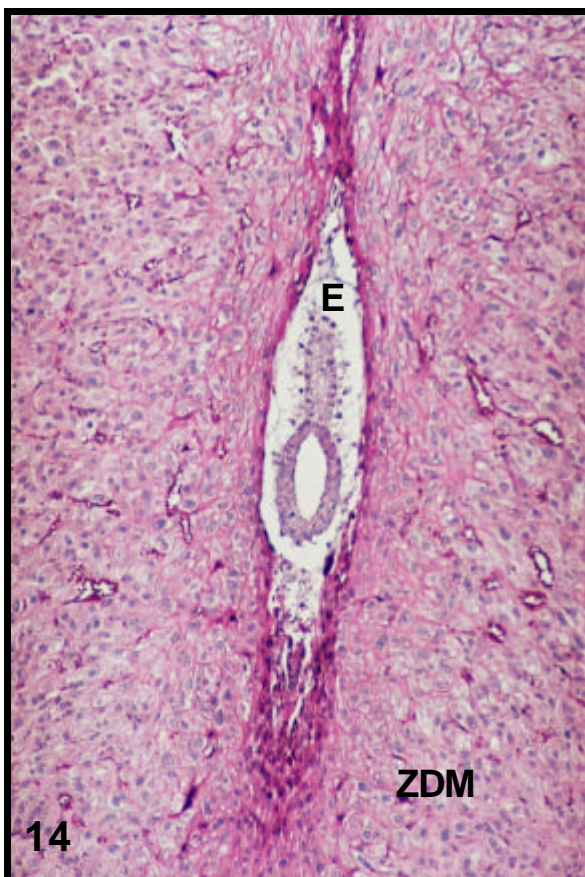
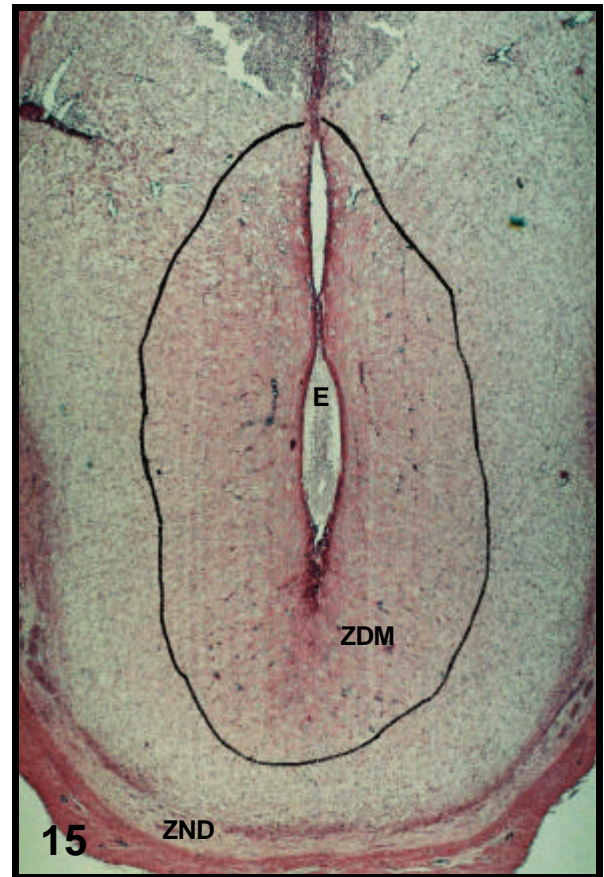
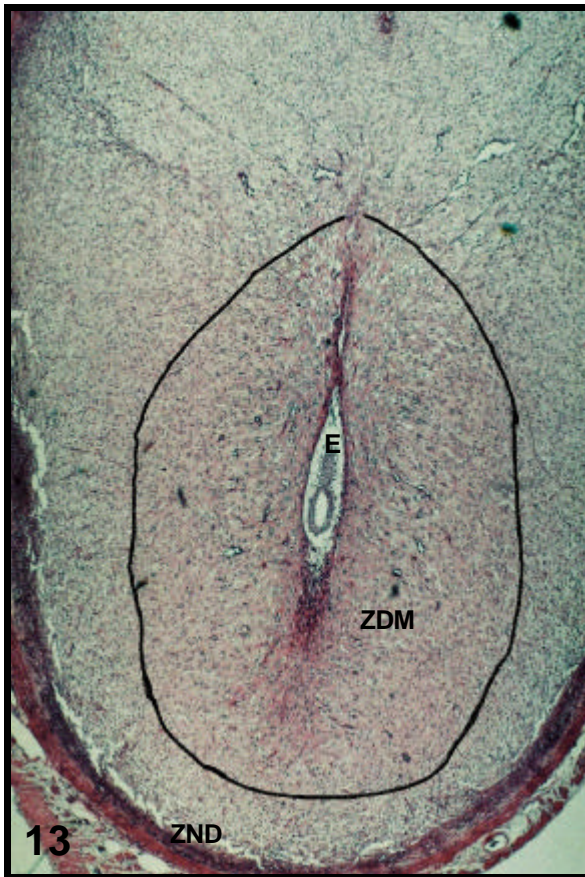


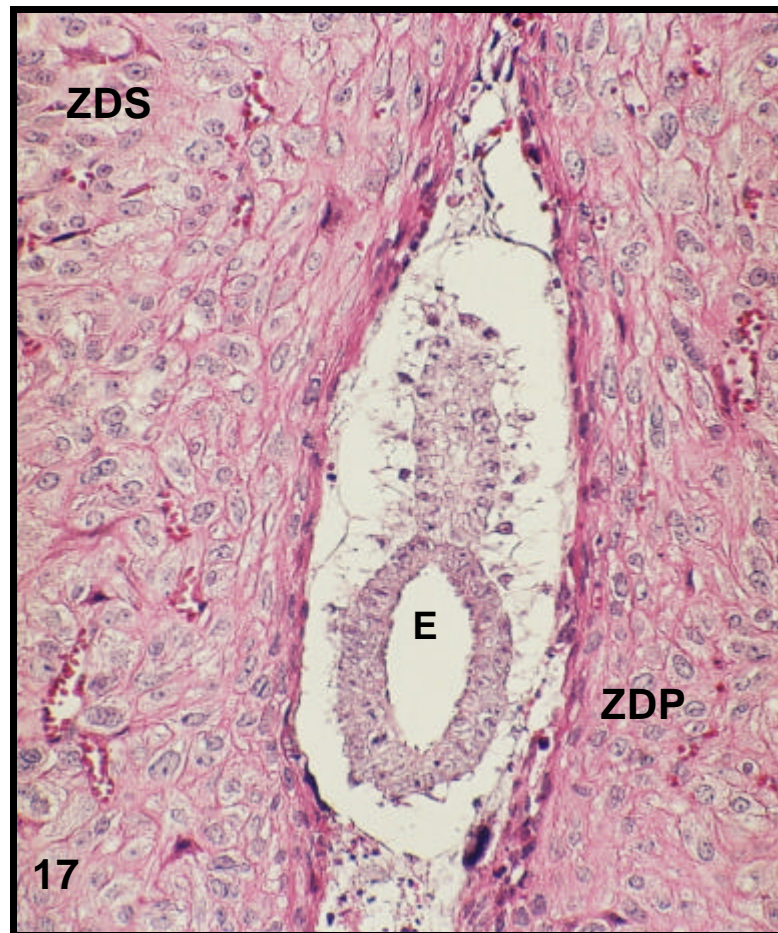


4.5.3 Dia 8 da gestação

No dia 8 da gestação ocorre o máximo desenvolvimento da região da decídua antimesometrial. O desenvolvimento do embrião estava de acordo com o período gestacional e observamos um maior número de células trofoblásticas invadindo a ZDM. A ZDM contendo as células deciduais maduras era a região mais evidente e maior quando comparada com o dia anterior. As sub-regiões, a ZDP e a ZDS não apresentavam separação evidente. Observamos também maior número de vasos sanguíneos na ZDM comparado com os dias anteriores. A ZPD apresentava constante redução com o passar da gestação e a ZND com as glândulas endometriais, estava restrita às adjacências do miométrio.

Neste dia, como nos anteriores, na análise morfométrica observamos que os animais com a DZA tinham um comprimento (espessura) e área da ZDM maiores que aqueles com DZD. Os valores do comprimento para os animais com dieta zinco adequada apresentavam $945 \pm 182 \mu\text{m}$ e aqueles com dieta zinco deficiente $814 \pm 202 \mu\text{m}$. A área neste dia de gravidez para animais com dieta zinco adequada apresentava $14487 \pm 3287 \mu\text{m}^2$ e $11968 \pm 4560 \mu\text{m}^2$ naqueles com dieta zinco deficiente.





4.6 Análise Morfométrica

No gráfico 12 observamos a evolução do comprimento da região decidual primária nos dias estudados.

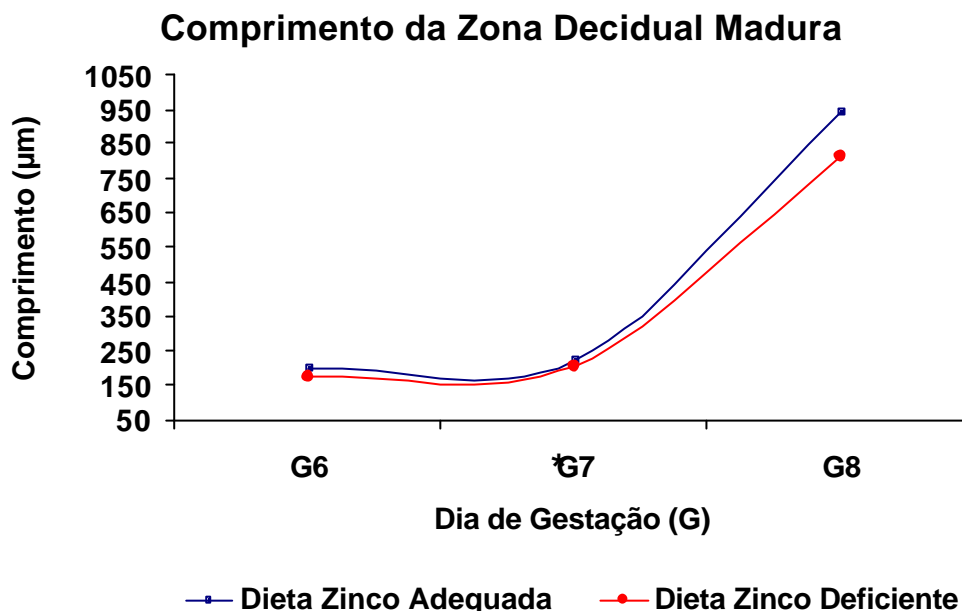


Gráfico 12 – Espessura (Comprimento) da Zona Decidual Madura em ratas alimentadas com Dieta Zinco Adequada (37?g Zn/g) e Dieta Zinco Marginalmente Deficiente (6?g Zn/g). *Diferença significativa para o grupo DZA, $P < 0,05$.

O dia 6 da gestação representa a fase de início de decidualização e observou-se uma maior delimitação entre a ZDM e ZPD (Figuras 5 e 6). Para os dias 7 e 8 de gestação esta delimitação foi menos evidente. A média do comprimento da ZDM aumentava com o passar dos dias da gestação. Com relação aos grupos com DZA e com DZD, em ambos os dias a ZDM foi maior para os animais com a dieta padrão, tanto no dia 6 como no dia 7. Neste último, verificou-se que o desenvolvimento e o aumento do comprimento da região decidualizada era pequeno, não sendo estatisticamente significativo para o primeiro dia, mas apresentava diferença estatística no segundo.

Como relatado por FINN (1977) a decidualização atinge seu ponto máximo de desenvolvimento no dia 8 da gestação. Neste dia, observamos um grande desenvolvimento com um proeminente aumento do comprimento de ZDM. Os

animais tratados com DZD apresentavam menor comprimento da ZDM, porém os dados não apresentaram diferença estatística significativa.

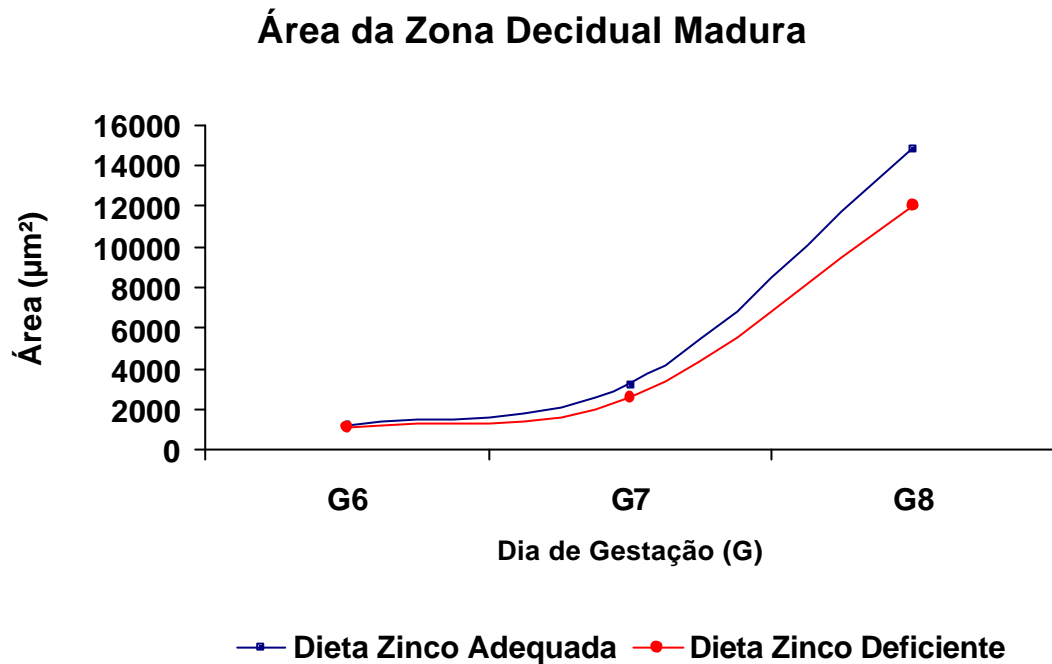


Gráfico 13 – Área da Zona Decidual Madura em ratas alimentadas com Dieta Zinco Adequada (37?g Zn/g) e Dieta Zinco Marginalmente Deficiente (6?g Zn/g) $P > 0,05$.

A média da área da Zona Decidual Madura está representada no gráfico 13. Observou-se aumento desta com o passar dos dias de gestação. Também como verificado anteriormente para o comprimento, a área da ZDM para os animais com a DZA estava maior, mas os resultados não apresentam diferenças estatisticamente significantes.

5 DISCUSSÃO

Após estudar a literatura e uma vez encerrada a obtenção dos resultados das metodologias empregadas, para facilitar a compreensão, decidiu-se dividir a discussão dos resultados em 03 partes, iniciando por: 1) análise dos dados referentes ao consumo de ração e ganho de peso dos animais; 2) discussão da dosagem do zinco plasmático dos grupos experimentais e; 3) discussão do número e histologia dos sítios de implantação.

5.1 Consumo de Ração e Ganho de Peso com Dietas DZA e DZD

Conforme a metodologia empregada, o consumo de ração durante a fase de crescimento foi avaliado em duas etapas diferentes, com animais agrupados (3 por gaiola) e individualizados. Na primeira etapa, o consumo médio de ração para o período foi de $12,2 \pm 2,0$ g para o grupo com DZA e $11,7 \pm 1,6$ g para o grupo com DZD. Na segunda etapa, com os animais individualizados, o consumo médio de ração foi para o grupo com DZA de $11,6 \pm 2,6$ g e para os animais com DZD $11,9 \pm 2,9$ g. Aplicando-se a metodologia estatística concluímos que não há diferenças entre ambos os dados.

Nossos resultados conflitam com relatos da literatura. Salgueiro et al (2000) relataram que ratas consumindo uma dieta deficiente em zinco, reduzem a ingestão total de alimento em aproximadamente 50% quando comparada com ratas com dieta adequada em zinco. Portanto, os resultados deste estudo, em ambos os grupos e dietas, ocorreu aumento progressivo da ingestão de ração e a média dos consumos das dietas foram iguais, já avaliando os grupo individualizados foi maior para o grupo com DZD.

Os resultados deste estudo em relação ao ganho de peso médio durante a fase de crescimento durante 9 semanas após o desmame, foi de $183,5 \pm 21,0$ g para o grupo com DZA e aqueles com DZD $184,0 \pm 16,2$ g no período, sem apresentar diferença estatística. LOWE et al. (1999), verificaram que o ganho de peso final no período de crescimento por um período de 6 semanas (42 dias), para o grupo com DZA ($37\mu\text{g}$ de Zn/g) foi de $190,3 \pm 11,7$ g e com DZD ($6\mu\text{g}$ de Zn/g) $181,2 \pm 9,7$ g apresentando, portanto, diferença estatística. No acompanhamento de evolução do

ganho de peso, estes autores observaram que 5 das 7 médias do ganho de peso apresentavam diferenças estatísticas e o ganho de peso final apresentou diferença estatística significativa verificando que, o zinco reduz o ganho de peso. Porém, estes utilizaram uma amostra de 8 animais por grupo por um período de 42 dias na fase de crescimento, um número relativamente menor que o analisado por este trabalho, que avaliou 42 animais por grupo durante um período maior, que foi de 60 dias.

Nas análises, o consumo médio de ração no período gestacional, durante os seis primeiros dias da gestação para os animais com dieta padrão foi de $14,3 \pm 2,0$ g, sendo que para os com dieta controle, o consumo foi de $13,3 \pm 2,5$ g no período. Para os animais analisados durante os sete dias iniciais da gestação, o consumo médio foi de $14,4 \pm 2,3$ g para a DZA e $14,1 \pm 1,2$ g para a DZD. Já para os 8 dias de gestação, a quantidade ingerida foi de $14,9 \pm 3,9$ g e $15,1 \pm 1,3$ g respectivamente para os grupos com DZA e DZD. Vale então realçar que em neste modelo experimental, os dados referentes ao consumo de ração se referem aos 08 primeiros dias da gestação. A literatura mostra resultados referentes ao período total da gestação de ratas (cerca de 21 dias). Tanto Morgan et al (1995) como Lowe et al (1999) observaram que durante o período de gestação há uma redução do consumo de ração zinco deficiente e ao final desta, a quantidade consumida foi menor em ambos os grupos de dieta sendo a DZA foi de 19,0g/dia de média e 16,2g no dia 19 da gestação e para a DZD foi 13,5g/dia de média e 3,8g no dia 19 da gestação, respectivamente e, ainda o segundo autor verifica que há redução do consumo estatisticamente significativa a partir do 6º dia de gravidez. Como não há menção da literatura acerca destes dados na fase inicial da gestação, talvez neste ponto se explique à razão deste conflito de resultados.

O ganho de peso durante a gestação nos dias (6, 7 e 8) não foram encontradas diferenças estatísticas. Para os animais avaliados até o dia 6 da gestação, a média do ganho de peso foi de $12 \pm 4,4$ g para as ratas com DZA e aqueles com DZD foi $8,6 \pm 7,6$ g no período. Para os que chegaram ao dia 7 da gestação, os que consumiam DZA foi $15,6 \pm 7,3$ g e aqueles com DZD foi $13,7 \pm 4,8$ g no período. Já para os animais no dia 8 da gestação, para o grupo DZA foi $17,5 \pm 4,6$ g e do grupo DZD foi $14,3 \pm 3,1$ g. Confrontando-se os resultados com a literatura, MORGAN et al. (1995), oferecendo DZA contendo $50\mu\text{gZn/g}$ e DZD com menos de $0,5\mu\text{gZn/g}$ de ração, verificaram que o grupo com DZD não ganharam peso durante o período ($-0,1 \pm 3,2$ g/d) e Lowe et al. (1999) e DZA com $30\mu\text{gZn/g}$ e DZD com

6µgZn/g. verificaram que houve um ganho de peso nos grupo com DZA e DZD, mas, aqueles animais que receberam uma DZA, o ganho foi maior e estatisticamente significativo, comparado com o grupo que utilizou DZD. Entretanto, mais uma vez chamamos a atenção para o fato de que nestes os estudos, os autores fizeram análises levando os grupos de animais até o final da gravidez.

5. 2 Concentração do Zinco Plasmático

A dosagem da concentração de zinco plasmático foi um dado extremamente importante para a evolução deste estudo, uma vez que com isso foi possível auferir se realmente havia deficiência da ingestão de zinco pelos animais.

Os resultados obtidos durante os dias de gestação estudados, mostraram que ocorre uma queda na concentração plasmática de zinco. No dia 6 da gestação as concentrações foram de 216 ± 53,4 µmol/L e 197,0 ± 35,1 µmol/L. No dia 7 os valores foram de 196,3 ± 26,3 µmol/L e 206,5 ± 54,1 µmol/L, enquanto que no dia 8 obtivemos 156,0 ± 19,9 µmol/L e 173,4 ± 35,3 µmol/L, ambos resultados respectivos para DZA e DZD. O tratamento estatístico dos dados mostrou inexistência de diferença significativa.

Morgan et. al. (1995) observaram as concentrações plasmáticas em seus experimentos em animais com DZA o valor foi 18,2 ± 0,5 µmol/L e animais com DZD 6,3 ± 0,9 µmol/L e Lowe et. al. (1999) tiveram os mesmos resultados e animais com DZA 16,1 ± 2,3 µmol/L e com DZD 4,1 ± 0,6 µmol/L mas ambos os autores determinaram estes valores ao final da gestação.

Jankowski-Hennig et al (2000) obtiveram os seguintes resultados para a concentração plasmática para o 11º de gravidez. No grupo controle a concentração foi de 16,3 ± 0,3 µmol/L e no grupo que tinha dieta zinco deficiente mas que os embriões exibiam modelo de morte celular com o grupo controle foi de 6,6 ± 1,1 µmol/L e no grupo com DZD que tiveram aumento de morte celular a concentração foi de 2,6 ± 0,2 µmol/L.

Como mostra a literatura, a concentração plasmática de zinco sempre é um bom indicador para se saber o estado nutricional de um animal. APGAR (1992), relatou em diversos experimentos que as concentrações de zinco não estavam associadas com mal-formações dos embriões, isto quando a redução da

concentração era de 15%, pois o catabolismo de diversos tecidos maternos mantinham uma concentração de zinco plasmático no mesmo nível de ratas tratadas com dieta zinco deficiente, quando comparados com animais que recebem quantidades adequadas do metal. Contudo, quando a diminuição da concentração ocorria numa faixa maior, entre 20 a 30%, (o qual aparece em animais com ingestão marginal de zinco na dieta), APGAR (1992), sugere que ocorra uma deficiência marginal do metal, e desta forma não predispõe a uma estimulação do catabolismo materno podendo resultar em um maior déficit nos fetos quando um consumo for baixo. Resultados semelhantes foram relatados por VALLE & FALCHUK (1993), onde os autores descrevem uma diminuição da concentração plasmática do metal em 30% nos primeiros dias da gravidez.

Dados mais recentes da literatura apontam os mesmos resultados. Segundo JANKOWSKI-HENNIG et. al. (2000) concentrações de zinco plasmática são mais baixas seguindo o controle do consumo de quantidades de zinco em dietas. Contudo, quando o consumo de alimentos é baixo, níveis plasmáticos de zinco são relativamente altos, presumivelmente devido ao catabolismo dos tecidos e liberação de zinco retido nestes. Para o desenvolvimento do conceito, o aumento de morte celular embrionária ocorre quando as concentrações de zinco plasmático materna são relativamente baixas. Relatado por JANKOWSKI-HENNIG et. al. (2000) que o zinco plasmático materno é a primeira fonte de zinco para o desenvolvimento do embrião, sendo sensato sugerir que a baixa concentração de zinco no plasma materno pode iniciar uma morte celular excessiva

A dieta marginalmente deficiente em zinco utilizada neste estudo não afetou a morfologia do embrião como é relatado por JANKOWSKI-HENNIG et al. (2000) que verificaram que ratas com dieta zinco deficiente contendo 0,5 µgZn/g de ração tiveram um aumento da morte celular por apoptose. LOWE et al (1999) observaram ausência de anormalidades congênitas em seu estudo, o qual utilizou dieta marginalmente deficiente em zinco contendo 6,0 µgZn/g de ração.

Segundo HARDING et. al (1988), VALLE & FALCHUK (1993) e SALGUEIRO et al. (2000) o zinco é componente de várias metaloenzimas que controlam a expressão gênica, na divisão celular, desenvolvimento e diferenciação. Também relatam que o zinco liga-se ao DNA e RNA na replicação, transcrição e na estrutura da cromatina e proteínas reguladoras de gene zinco dependente, portanto células zinco deficientes, falham para dividir-se e diferenciar-se com conseqüente prejuízo no crescimento de animais e humanos.

Diversos autores, entre eles, VALLE & FALCHUK (1993), SALGUEIRO et al. (2000) e KING et al. (2000) relataram que a homeostase fisiológica do Zinco para a manutenção do metabolismo celular é altamente regulada nos processos de absorção por um mecanismo compensatório para aumentá-lo no trato gastrointestinal, o principal local para a regulação do balanço, a absorção mediada por carreador aumenta a afinidade e a transferência através da mucosa e o pâncreas secreta maior quantidade de uma proteína ligante de zinco que intensifica a sua absorção e esta ligante pode ser uma metalotioneína (MT), outro mecanismo para uma menor eliminação do mineral no trato digestivo e renal e um terceiro que envolve o reaproveitamento metabólico por atuação de proteínas queladoras e receptoras de zinco (Tioneínas e Metaloproteínas) e uma regulação da concentração corpórea se esta reduzir, principalmente no plasma ocorrendo um catabolismo celular para a manutenção desta homeostasia. No corrente trabalho acredita-se que estas adaptações celulares foram possíveis decorrentes de um longo período da utilização de dieta marginalmente deficiente em zinco, a qual, nos nossos animais tratados não pude-se observar drásticas alterações no crescimento e gestacional.

Os achados justificam-se ao analisar na literatura que ocorrem ajustamentos fisiológicos no metabolismo do zinco quando ingestões forem marginais para manter a embriogênese, pois segundo KING et al. (2000), o organismo tem a capacidade de manter relativamente constante as concentrações de zinco mesmo quando consumo do metal na dieta possa variar por mais de 10 vezes.

5.3 Número de Sítios de Implantação e Morfologia da Decídua

A verificação do número dos sítios de implantação representa um parâmetro de comparação para o sucesso da implantação dos embriões, uma vez que o contato e fixação do embrião com o epitélio uterino contribui para o início do desenvolvimento de uma resposta decidual pelos fibroblastos endometriais permitindo a esta resposta uma eficiência no processo gestacional. Dietas deficientes em zinco aumentam o número de embriões reabsorvidos e anormalidades morfológicas o qual ocasiona ao final da gestação uma menor eficácia reprodutiva (MORGAN et al., 1995; DALTON et al., 1996; JANKOWSKI-HENNIG et al., 2000)

Como descrito no capítulo Resultados, o número de sítios de implantação do grupo com DZA apresentou $11,2 \pm 1,8$ sítios, enquanto que o grupo com DZD possuía $10,3 \pm 1,7$, o que significa que a comparação das dietas não apresentou diferenças estatísticas. Estes dados corroboram com os obtidos por Morgan et al. (1995) que observaram que para o grupo com dieta Zn adequada houve $11,9 \pm 0,6$ sítios e para os animais com dieta zinco deficiente foi de $12,1 \pm 0,3$. Mas ao final da gestação o grupo com DZD apresentou $5,3 \pm 1,0$ sítios de implantação reabsorvidos.

Vários relatos da literatura apontam para resultados semelhantes os achados neste estudo. ANDREWS & GEISER (1999) utilizando por 8 dias de gestação uma dieta zinco adequada com $50 \mu\text{gZn/g}$ de ração e dieta zinco deficiente com $1 \mu\text{gZn/g}$, apresentaram $12,0 \pm 1,0$ e $10,0 \pm 2,0$ sítios de implantação para as respectivas dietas. Lowe et al. (1999) com dieta controle ao final da gestação, verificaram 15 ± 2 fetos e com dieta deficiente para o zinco 12 ± 3 fetos. Fica evidente que a carência de zinco é um fator que influencia no sucesso gestacional.

Outros relatos da literatura apontam para diferenças importantes quanto à morfologia dos embriões. Apesar deste estudo não ter aprofundado em relação às características nos resultados histológicos, uma vez que interessava a condição do tecido endometrial (a decídua antimesometrial), os embriões apresentaram aspecto morfológico normal para os respectivos dias 6, 7 e 8 da gestação. Além disso, estas análises acerca da condição dos embriões já parecem estar bem definidas, sendo inegável a importância do Zn para o desenvolvimento embrionário adequado.

APGAR (1992) e HARDING et al. (1988) relataram que embriões expostos à severa dieta zinco-deficiente materna, apresentaram extensiva morte celular no tubo neural nos dias 8 e 9. Seguindo as análises para o dia 11 da gestação, os embriões mostraram teratologia para o sistema nervoso, como por exemplo, não-fechamento do tubo neural e desenvolvimento neural retardado. De acordo com JANKOWSKI-HENNIG et al (2000) a indução de morte celular pela deficiência de zinco é mais evidente em embriões com 11 dias de gestação.

VALLE & FALCHUK (1993) em ampla revisão sobre as bases bioquímicas e fisiológicas do zinco, relataram uma série de anormalidades em embriões de mães zinco-deficientes em estágios precoces de 5 células até os estágios de blastocisto, com diferenças no tamanho dos blastômeros, anormalidade da cavidade de blastocelo ocorrendo desenvolvimento retardado e anormal para os pólos embriônicos. ANDREWS & GEISER (1999) observaram que 17,6% dos embriões apresentavam efeitos teratogênicos para o dia 8 da gestação. No dia 14 de

gestação, 32% apresentavam morfologia anormal quando utilizada uma dieta zinco-deficiente com 1 µg/g zinco por de ração. Quando foi utilizada uma dieta com 5 µg/g de zinco de ração, a taxa de efeitos teratogênicos caiu para 4.7% dos embriões.

Como mencionado anteriormente, apesar da literatura mostrar relatos acerca do número de sítios de implantação e também da condição morfológica dos embriões, não há descrições sobre as características histológicas do componente materno do processo gestacional, ou seja, a decídua. Vale realçar que, para os dias iniciais da implantação embrionária, à parte do endométrio que está envolvida é a porção antimesometrial do útero, o que justificou o enfoque deste estudo para os dias 6 (dia da implantação e aparecimento da decídua), 7 (caracterizada pelo crescimento da decídua antimesometrial) e 8 da gestação (dia máximo do desenvolvimento da decídua e início do processo de involução da mesma).

As observações dos cortes histológicos dos sítios de implantação (como já justificado, os dias 6, 7 e 8), mostraram, comparando-se os animais dos grupos DZA e DZD, que as diferentes regiões deciduais apresentam desenvolvimento normal aparentemente semelhante. As análises morfométricas foram fundamentais, pois permitiram detectar pequenas diferenças, porém não significativas tanto no comprimento e principalmente na área ocupada na Zona Decidual Madura (ZDM).

Na análise morfométrica, foi analisado o comprimento médio da Zona Decidual Madura (ZDM) com o propósito de verificar se o zinco tem alguma influencia no desenvolvimento da decidualização, visto que uma possível falha no processo pode se relacionar com uma menor eficiência reprodutiva. De acordo com Abrahamsohn e Zorn (1993) um desenvolvimento ideal do embrião e do endométrio deve ocorrer para o sucesso do processo de implantação.

Leão (2002) realizando morfometria para ratas no dia 6 da gestação, utilizando dieta padrão do Biotério da UFPR verificou que a área da ZDM apresentava 1256 µm², o que deduzimos que ambas as dietas zinco adequada e deficiente por nos utilizada não afeta a área de decidualização neste dia.

Após as análises conclui-se que tanto o comprimento como a área da ZDM, para ambas as dietas, não houve redução ou aumento significativo de seus valores. Estes resultados inéditos, mostram que pelo menos para o início da gestação, a disponibilidade maior ou menor de zinco para o endométrio ainda não é uma condição fundamental. Denota-se, pelas análises da concentração plasmática do metal, pela análise do consumo de ração e ganho de peso, e pela quantidade de sítios de implantação, que há uma doação e sacrifício da condição metabólica

materna em benefício da sua prole em desenvolvimento. Pelo que mostram estes resultados, a carência de zinco vai se manifestar como uma condição vital, nas fases mais avançadas da gestação.

Como considerações finais e recomendações futuras, uma análise mais detalhada em microscopia eletrônica, poderão mostrar diferenças mais acentuadas. Ao longo dos últimos três anos, este laboratório tem procurado estudar a relação entre a condição satisfatória de desenvolvimento da decídua antimesometrial de ratas com a influência de diversos fatores que concorrem, tanto a favor como contra ao processo de implantação. Neste sentido, já foram desenvolvidos estudos referentes à disponibilidade de glicogênio na decídua e estudos relativos à influência de substâncias agonistas aos hormônios esteróides ovarianos (tais como o tamoxifeno) com os níveis de estrogênio durante o início da gestação.

Na literatura, a implantação embrionária compreende uma série complexa de eventos que se iniciam com as etapas de fixação e invasão do blastocisto no endométrio. Estes eventos apenas acontecem nas áreas uterinas onde há a presença do embrião, os sítios de implantação. Além dos eventos celulares clássicos já descritos pela neste estudo e na literatura, durante a fase de implantação e decidualização também ocorrem importantes modificações e redistribuição de componentes da matriz extracelular. Dentre vários eventos relacionados, podemos mencionar que em ratas tal remodelação inclui, por exemplo, aumento da expressão de laminina e colágeno tipo IV, coincidente com redução da expressão de colágeno fibrilar, tenascina e fibronectina (Hurst, 1999; Nuttall, 1999; Bany, 2000).

Uma vez o blastocisto fixado no epitélio uterino, observa-se uma marcante fase de transição pela expansão da blastocela (Farrar, 1992). A camada trofotodermal circundante do embrião diferencia em duas populações celulares: as células trofoblásticas gigantes primárias e as secundárias. Tais células gigantes adquirem a capacidade de invadir o estroma uterino, na medida em que células deciduais degeneram. Desta forma os espaços antes ocupados pelas células deciduais, tornam-se preenchidos pelas células trofoblásticas do embrião (Romagnano, 1990). Segundo estes autores, as células trofoblásticas gigantes secundárias, ao invadirem o meio endometrial, estabelecem contato com a matriz extracelular materna, constituída basicamente por: laminina, fibronectina e colágeno tipo IV.

O colágeno tipo IV é uma glicoproteína preferencialmente encontrada em qualquer membrana basal de organismos adultos, bem como nas membranas fetais

(Lei, 1999). Através de estudos de imunomarcação com anticorpos monoclonais para colágeno tipo IV, Iwahashi et al. (1996), observaram que a glicoproteína é encontrada exclusivamente na membrana basal das glândulas endometriais e abaixo das células endoteliais de vasos sanguíneos do endométrio humano.

Além do colágeno tipo IV, a matriz extracelular (MEC) que envolve as células decíduais, é composta de colágeno fibrilar tipos I e III, colágenos de associação V e VI, laminina, entactina, fibronectina e proteoglicano heparan sulfato (classes Sindecana e Versican) (Korhonen, 1997; Greca et al., 2000). Durante a decidualização, a matriz de colágeno torna-se menos fibrosa, além de que o colágeno VI é removido (Nuttall, 1999; Bany, 2000).

Na decídua, componentes da membrana basal, tais como colágeno tipo IV e laminina, estão presentes na região pericelular das células decíduais. O acúmulo de pericelular de componentes de membrana basal, incluindo colágeno tipo IV e laminina, pode estar associado com os processos de decidualização do endométrio (Iwahashi 1996).

As metaloproteinases (MMPs) são proteinases extracelulares dependentes de Zn, consideradas metaloenzimas. Tem importante função na capacidade metastática (Valle, 1993; Spencer, 1998; Bany, 2000), na morfogênese, angiogênese, cicatrização, modulação de moléculas biologicamente ativas e degradação da matriz extracelular (Vu, 2000). São necessárias durante o período inicial da implantação, desempenhando substancial atividade uterina. Estes eventos são consistentes com o extraordinário crescimento e remodelação do endométrio que ocorre na preparação para a implantação, decidualização e placentação (Sharkey, 1996; Spencer, 1998). Acredita-se também que as MMPs estejam envolvidas na mediação e remodelação associada com decidualização, enquanto os inibidores podem ter a função adicional no controle da extensão da invasão trofoblástica (Nuttall, 1999). Todo o processo de remodelação do tecido endometrial necessita de um balanço entre a atividade das MMPs e seus inibidores naturais, as TIMPs (Inibidores Teciduais das Metaloproteinases). Sharkey et al. (1996), mostraram evidências de que hormônios, fatores de crescimento e citocinas influenciam os níveis de MMP durante a implantação, regulando os mecanismos da expressão de genes de MMPs endometriais.

As MMPs incluem as collagenases, gelatinases, estromelisinases e metaloelastases (Nuttall 1999). As collagenases constituem uma família de MMPs que degradam colágeno tipo I fibrilar; enquanto que as Gelatinases degradam o

colágeno tipo IV. Nesta classe há ainda 2 membros de diferentes pesos moleculares, a MMP-2 (gelatinase A) e a MMP-9 (gelatinase B) (Morgan, 1998; Vu, 2000). As MMPs uterinas são secretadas na forma de pró-enzimas (zimogênio) latentes e ativadas por processamento proteolítico. A MMP-2 (em particular a gelatinase A de 72 kDa), e a MMP-9 (uma gelatinase B de 92 kDa) degradam colágeno tipo IV (Sharkey, 1996). Estudos obtidos de zimogramas de células do estroma endometrial em cultura de 72 horas mostraram uma MMP-9 latente e uma MMP-9 de 92 kDa ativa (Nuttall, 1999).

Durante a decidualização, a zona decidual primária desenvolve-se rapidamente. Enquanto isso, o rearranjo e degradação de colágeno continua em processo. Segundo Hurst et al. (1999), as MMPs estão presentes ao redor das células deciduais, agindo no metabolismo e rearranjo do colágeno endometrial. Sabe-se que a MMP-9 ataca os componentes da MEC tais como colágeno tipo IV e V e fibronectina durante a decidualização. Sharkey et al. (1996) e Bany et al. (2000) estudaram útero de camundongas por zimografia e Northern Blot, durante os primeiros sete dias de gestação, detectando 4 classes de proteinases degradadoras de gelatina: A) uma de 65; B) outra de 72; C) mais uma de 92 e, D) uma de 80 kDa. As 3 primeiras co-migraram com três MMP conhecidas, as MMP-13, MMP-2 e MMP-9 respectivamente. O autor relata ainda que há aumento da secreção da atividade de MMPs começando no dia 2 continuando até o dia 6. De acordo com Hurst et al. (1999), as MMPs poderiam estar ativas nas regiões do tecido para facilitar o metabolismo das proteínas da MEC e, conseqüentemente, poderiam ser consideradas como um importante contribuidor para a remodelação uterina em resposta à implantação do embrião. É também plausível que MMPs estejam associadas com as características invasivas de trofoblasto.

Morgan et al. (1998), demonstraram que um anticorpo específico de função inibidora para a MMP-9 impediu completamente a invasão do trofoblasto, concluindo que a MMP-9 é uma enzima crítica para a invasão embrionária. As linhagens de células trofoblásticas que expressaram MMP-2 e MMP-9 foram capazes de realizar a invasão, enquanto que a linhagem de células mutantes (que produz MMP-2 em grandes quantidades, mas pouca quantidade de MMP-9), não eram invasivas.

Outros relatos da literatura determinaram que os decíduomas contém níveis atividade da MMP-9 semelhantes ao da decídua. Extratos de decíduoma induzido por óleo, o qual não contém trofoblasto embriônico, também produziu similar atividade da MMP-9 (Alexander, 1996). Utilizando imunohistoquímica, Hurst et al.

(1999), detectaram formas ativas de MMP-2 e MMP-9 nos sítios de implantação e decidualização de ratas grávidas e pseudográvidas.

Para finalizar, vale realçar que o presente estudo abriu novas perspectivas, o que permitirá dar continuidade aos trabalhos do laboratório, não só dentro da UFPR, mas principalmente em parceria com outras Instituições. Durante o transcorrer deste estudo, realizamos protocolos-piloto imunohistoquímicos da presença de fibronectina e colágeno tipo IV (visto que ambas são substratos da MMP9), nos cortes dos sítios de implantação. Também fizemos, juntamente com o processamento histotécnico para microscopia de luz, o processamento de secções dos sítios de implantação para observação em microscopia eletrônica de transmissão. Também temos a intenção de desenvolver um modelo experimental semelhante, utilizando ratas pseudográvidas (para obtenção de decíduoma) e também estudos do efeito do Zinco na formação da decídua mesometrial, que está diretamente envolvida com o processo de placentação. Também intencionamos desenvolver projeto que tenha como um de seus objetivos a detecção da presença da MMP9. Sendo uma metaloenzima dependente de Zn, é de se esperar que na ausência do íon, haja comprometimento do processo de decidualização antimesometrial e mesometrial tanto na gestação normal (decídua) como na induzida (decíduoma).

6 CONCLUSÃO

- 1) A dieta marginalmente deficiente em zinco não altera a quantidade do consumo alimentar e conseqüentemente os resultados do ganho de peso são iguais para ambos os grupos de animais, estes tanto na fase de crescimento como no período inicial da gestação.
- 2) Os altos níveis plasmáticos verificados, provavelmente ocorreram por ajustamentos fisiológicos decorrentes da utilização por um longo período de dieta marginalmente deficiente e isto fez proteger os embriões de alterações morfológicas.
- 3) Uma dieta marginalmente zinco deficiente quando fornecida por longo período, permitindo que o organismo materno possa desenvolver adaptações fisiológicas não promove alterações importantes na morfologia da decídua, não afetando a região da ZDM permitindo um adequado desenvolvimento decidual.

ANEXOS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRAHAMSOHN, P. A.; ZORN, T. M. T. Implantation and decidualization in rodents. **J. Exp. Zool.**, 1993.
- ALEXANDER, C. M.; HANSSEL, E. J.; BEHRENDTSEN, O. et al. Expression and function of matrix metalloproteinases and their inhibitors at the maternal-embryonic boundary during mouse embryo implantation. **Development** 122: 1723 - 1736, 1996.
- ALLEN, E. The oestrous cycle in the mouse. **Am J. Anat.**, 30:297-371, 1922.
- APGAR, J. Zinc and reproduction: an update. **J. Nutr. Biochem.**, 3: 266 – 278 1992.
- ANDREWS, G. K.; GEISER, J. Expression of the mouse metallothionein-i and ii genes provides a reproductive advantage during maternal dietary zinc deficiency. **J. Nutr.** 129: 1643 - 1648, 1999.
- BANY, B. M.; HARVEY, M. B.; SCHULTZ, G. A. Expression of matrix metalloproteinases 2 and 9 in the mouse uterus during implantation and oil-induced decidualization. **Reproduction** 120: 125 - 134, 2000.
- BEÇAK, W. **Técnicas de citologia e histologia**. 1ª ed, 1970.
- CARLSON, D. C.; DUTT, A; TANG, J. P. Glycoconjugate synthesis during early pregnancy: hyaluronate synthesis and function. **Dev. Biol.**, 120: 228 - 235, 1987.
- DALTON, T.; FU, K.; PALMITER, R. D. et al. Transgenic mice that overexpress metallothionein-i resist dietary zinc deficiency. **J. Nutr.** 126: 825 - 833, 1996.
- DE FEO, V. J. Decidualization, In *Cellular Biology of the Uterus*. R. M. Ed., Amsterdam, North Holland, p.192 - 291, 1967.
- FARRAR, J. D.; CARSON, D. D. Differential temporal and spatial expression of mrna encoding extracellular matrix components in decidua during the peri-implantation period. **Biol. Reprod.** 46: 1095 - 1108, 1992.
- FINN, C. A.; MCLAREN, A. A study of the early stages of implantation in mice. **L. Reprod. Fert.**, 13: 259 - 267, 1967.
- FINN, C. A. The biology of decidual cells. **Adv. Reprod. Physiol.**, 5: 1 - 26, 1971.
- FINN, C. A. The implantation reaction. In: *Biology of the Uterus*. R.M.Wynn, ed. Plenum Press, New York, pp. 245 - 308, 1977.
- GRECA, C. P. S. **Estudo citoquímico ultra-estrutural associado a tratamento enzimático da matriz extracelular fundamenteal do endométrio de camundongas**. São Paulo, 1996, 130p. Tese de Doutorado, Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.
- GRECA, C. P. S.; ABRAHAMSOHN, P. A.; ZORN, T. M. T. Ultrastructural cytochemical study of proteoglycans in the endometrium of pregnant mice using cationic dyes. **Tissue & Cell.** 30 (3): 304 - 311. 1998.

HARDING, A. J.; DREOSTI, I. E.; TULSI, R. S. Zinc deficiency in the 11 day rat embryo : a scanning and transmission electron microscope study. **Life Sciences**, 42: 889 - 896, 1988.

HURST, P. K.; PALMAY, R. D. Matrix metalloproteinases and their endogenous inhibitors during the implantation period in the rat uterus. **Reprod. Fertil. Dev.** 11: 395 - 402, 1999.

IWAHASHI, M.; MURAGAKI, Y.; OOSHIMA, A. et al. Alterations in distribution and composition of the extracellular matrix during decidualization of the human endometrium. **J. Reprod. Fert.** 108: 147 - 155, 1996.

JACOB, C; MARET, W; VALLEE, B. I.; Control of zinc transfer between thionein, metallothionein, and zinc proteins. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**. Vol 95: 3489 -3494, 1998.

JANKOWSKI-HENNIG, M. A.; CLEGG, M. S.; DASTON, G. P.; et al. Zinc-deficient rat embryos have increased caspase 3-like activity and apoptosis. **Bioch. Biobiophys. Res. Com.** 271: 250 - 256, 2000.

KING, J. C.; SHAMES, D. M.; WOODHOUSE, L. R. Zinc homeostasis in humans. **J. Nutr.** 130: 1360S - 1366S, 2000.

KORHONEN, M. & VIRTANEN, I. The distribution of laminin and fibronectin is modulated during extravillous trophoblastic cell differentiation and decidual cell response to invasion in the human placenta. **J. Histochem. Cytochem.** 45(4): 569 - 581. 1997.

LEÃO, G. M. C. **Análise Histológica e Imunohistoquímica do Endométrio de Ratas Grávidas Tratadas com Tamoxifeno**. Curitiba, 2002. Dissertação de Mestrado, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

LEI, H.; KALLURI, R.; FURTH, E. E. ; et al. Rat amnion type IV collagen composition and metabolism: Implications for membrane breakdown. **Biol. Reprod.** 60: 176 - 182, 1999.

LOWE, N. M; WOODHOUSE, L. R; WEE, J; KING, J. C. Short-term zinc kinetics in pregnant rats fed marginal zinc diets. **J. Nutr.** 129: 1020 - 1025, 1999.

MCCALL, K. A.; HUANG, C. C.; FIERKE, C. A. Function and mechanism of zinc metalloenzymes. **J. Nutr.** 130: 1437S - 1446S, 2000.

MORGAN, M.; KNISS, D.; MCDONNELLS. Expression of metalloproteinases and their inhibitors in human trophoblast continuous cell lines. **Experimental Cell Research.** 242: 18 - 26, 1998.

MORGAN, P. N.; WEHR, C. M.; MACGREGOR, J. T.; et al. Zinc deficiency, erythrocyte production, and chromosomal damage in pregnant rats and their fetuses. **J. Nutr. Biochem.** 6: 263 – 268, 1995.

MURO, M. D. **Localização Imunocitoquímica de Laminina e Fibronectina na Decídua e no Deciduoma de Camundongos Fêmeas**. Curitiba, 2000. Dissertação de Mestrado, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

NUTTALL, R. K.; KENNEDY, T. G. Gelatinases A e B and tissue inhibitors of metalloproteinases 1, 2, and 3 during in vivo and in vitro decidualization of rat endometrial stromal cells. **Biol. Reprod.** 60: 471 - 478, 1999.

OLIVEIRA, S. F.; NAGATA, T.; ABRAHAMSOHN, P. A.; ZORN, T. M. T. Electron Microscopic radioautographic study on the incorporation of ³H-proline by mouse decidual cells. **Cell. Molec. Biol.**, 37: 315 - 323, 1991.

PARR, M.B.; PARR, E.L. Permeability of the primary decidual zone in the rat uterus: studies using fluorescein-labeled proteins and dextrans. **Biol. Reprod.**, v.34, p.393-403, 1986.

PETERS, J. M.; WILEY, L. M.; ZIDENBERG-CHERR, S.; KEEN, C. L. Influence of short-term maternal zinc deficiency on the in vitro development of preimplantation mouse embryos. **P.S.E BM V.** 198: 1561 - 1568, 1991.

PRASAD, A. S. Zinc deficiency in humans: A neglected problem. *J. Am. Coll. Nutr.* 17: 542-543, 1998.

PSYCHOYOS, A. La réaction déciduale est précédée de modifications précoces de la perméabilité capillaire de l'utérus. **C. R. Soc. Biol.** 154:1384-7, 1960.

PSYCHOYOS, A. Perméabilité capillaire et décidualisation utérine. **C.R. Seances Soc. Biol.** 252:1515-7, 1961.

REEVES, P. G. Components of the AIN-93 diets as improvements in the AIN-76^A diet. **J. Nutr.** 127: 838S - 841S, 1997

ROMAGNANO, L.; BABIARZ, B. The role of murine cell surface galactosyltransferase in trophoblast: laminin interactions in vitro. **Develop. Biol.** 141: 254 - 261, 1990.

SALGUEIRO, M. J.; ZUBILLAGA, M.; LYSIONER, A.; et al. Zinc as an essential micronutrient: A review. **Nutrition Research**, 20: 737–7 55, 2000.

SHARKEY, M. E.; ADLER, R. R.; NIEDER, G. L. and BRENNER, C. A. Matrix metalloproteinase expression during mouse peri-implantation development. **Am. J. Reprod. Immun.** 36: 72 - 80, 1996.

SHELESNYAK, M. C. Inhibition of decidual cell formation in the pseudopregnant rat by histamine antagonists. **Am. J. Physiol.**, 170: 522 - 527, 1962.

SOARES GRECA, C. P.; NADER, H. B.; DIETRICH, C. P.; ABRAHAMSHON, P. A.; ZORN, T. M. T. Ultrastructural cytochemical characterization of collagen associated proteoglycans in the endometrium of mice. **Anat Rec**, 259: 413 - 423, 2000.

SPENCER, F.; CHI, L.; ZHU, M. X. Time-dependent relationship between the estrogen receptors and the matrix metalloproteinases following deciduoma induction in rats. **Comp. Bioch. Phys. Part. C** 120: 283 - 288, 1998.

TEODORO, W. P. R. **Quantificação e caracterização bioquímica e imunoquímica do colágeno no endométrio de camundongas virgens e grávidas.** São Paulo, 1995. 104p. (Dissertação de Mestrado, Instituto de Ciências Biomédicas da Univ. de São Paulo).

TANHOFFER, E. A. **Influência do tumor de Walker 256 sobre os níveis de glicogênio decidual em ratas e taxa de sucesso na implantação do blastocisto no útero.** Curitiba, 2001. 58p. (Dissertação de Mestrado, Departamento de Biologia Celular da Universidade Federal do Paraná).

VALLE, B. L.; FALCHUK, K. H. The biochemical basis of zinc physiology. **Physiol. Reviews** 73: 79 - 118, 1993.

VU, T. H.; WERB, Z. Matrix metalloproteinases: effectors of development and normal physiology. **Genes & Development** 14: 2123 - 2133, 2000.

ZORN, T. M. T.; BEVILACQUA, E. M. A. F.; Abrahamsohn; P. A.. Collagen Remodeling during decidualization in the mouse. **Cell Tissue Res.**, 244: 443 - 448, 1986.

ZORN, T. M. T.; PINHAL, M. A. S.; NADER, H. B.; CARVALHO, J. J.; ABRAHAMSOHN, P. A.; DIETRICH, C. P. Biosynthesis of Glycosaminoglycans in the endometrium during the initial stages of pregnancy of the mouse. **Cellular and Molecular Biology**, 41 (1): 97 - 106, 1995.